Postverlagsort Berlin

PLANTA

ARCHIV FÜR WISSENSCHAFTLICHE BOTANIK

UNTER MITWIRKUNG VON

J. BONNER-PASADENA, **A. ERNST**-ZÜRICH, **H. v. GUTTENBERG**-ROSTOCK
R. HARDER-GÖTTINGEN, **O. RENNER**-MÜNCHEN, **W. SCHUMACHER**-BONN

HERAUSGEGEBEN VON

W. RUHLAND UNTERDEUFSTETTEN — **L. BRAUNER** MÜNCHEN — **E. BÜNNING** TÜBINGEN

51. BAND, 1. HEFT

MIT 44 TEXTABBILDUNGEN

(ABGESCHLOSSEN AM 27. FEBRUAR 1958)

SPRINGER-VERLAG
BERLIN · GÖTTINGEN · HEIDELBERG
1958

Planta (Berl.)

Preis DM 19.80

Planta, Archiv für wissenschaftliche Botanik

Begründet 1925. Band 1—34 (1945) herausgegeben von *W. Ruhland* und *H. Winkler*. (Band 1—21, 1934, als „Zeitschrift für wissenschaftliche Biologie", Abteilung E). Band 35—47. Herausgegeben von *W. Ruhland* und *O. Renner*.

Die Zeitschrift „Planta", Archiv für wissenschaftliche Botanik, steht in deutscher Sprache oder einer der Kongreßsprachen, sofern sie die Muttersprache des Autors ist, abgefaßten Originalarbeiten aus dem Gesamtgebiet der Botanik, abgesehen von solchen rein systematischen oder floristischen Inhalts, offen.

Arbeiten, welche einen Vermerk des Verfassers „Kurze Mitteilung" tragen, werden sobald wie möglich außerhalb der Reihenfolge des Eingangs abgedruckt. Ihr Umfang darf 4 Druckseiten nicht überschreiten; die Beigabe von Abbildungen ist nur in Ausnahmefällen angängig.

Die Zeitschrift erscheint zur Ermöglichung raschester Veröffentlichung zwanglos in einzeln berechneten Heften, die zu Bänden vereinigt werden.

Der Autor erhält einen Unkostenersatz von DM 20.— für den 16seitigen Druckbogen, jedoch im Höchstfalle DM 40.— für eine Arbeit. Für „Kurze Mitteilungen" wird ein Unkostenersatz nicht erstattet.

Es wird ausdrücklich darauf aufmerksam gemacht, daß mit der Annahme des Manuskriptes und seiner Veröffentlichung durch den Verlag das ausschließliche Verlagsrecht für alle Sprachen und Länder an den Verlag übergeht. Grundsätzlich dürfen nur Arbeiten eingereicht werden, die vorher weder im Inland noch im Ausland veröffentlicht worden sind, und die auch nachträglich nicht anderweitig zu veröffentlichen der Autor sich verpflichtet.

Es ist ferner ohne ausdrückliche Genehmigung des Verlages nicht gestattet, photographische Vervielfältigungen, Mikrofilme, Mikrophotographien u. ä. von den Zeitschriftenheften, von einzelnen Beiträgen oder von Teilen daraus herzustellen.

Die Mitarbeiter erhalten von ihrer Arbeit bis auf weiteres zusammen 75 Sonderdrucke unentgeltlich.

Aufnahmebedingungen siehe 3. Umschlagseite.

Alle Manuskripte und Anfragen sind zu richten an

Professor Dr. Wilhelm Ruhland, (14a) *Unterdeufstetten über Crailsheim*, oder an
Professor Dr. Leo Brauner, *München 19*, *Menzingerstr. 67*, *Botanisches Institut der Universität*, oder an
Professor Dr. Erwin Bünning, *Tübingen*, *Botanisches Institut der Universität*, *Wilhelm-Straße 5*.

Springer-Verlag
Berlin W 35, Reichpietschufer 20, Fernsprecher 249251
und
Heidelberg, Neuenheimer Landstr. 28—30, Fernsprecher 27901

---

51. Band **Inhaltsverzeichnis** 1. Heft

Seite

KÖNITZ, W., Blühhemmung bei Kurztagpflanzen durch Hellrot- und Dunkelrotlicht in der photo- und skotophilen Phase. Mit 21 Textabbildungen. . 1

STEFFEN, K., und W. LANDMANN, Chondriosomen-, Sphärosomen- und Proplastidenzahlen in Beziehung zu den Differenzierungsvorgängen bei der Antherenentwicklung. Mit 2 Textabbildungen 30

FALK, H., Ein Beitrag zur Methode der quantitativen Chlorophyllbestimmung. Mit 3 Textabbildungen. 49

ČATSKÝ, J. und B. SLAVÍK, Eine neue Anwendung der CO_2-Bestimmung nach KAUKO zu Assimilationsmessungen. Mit 3 Textabbildungen 63

BERGMANN, L., Der Einfluß von Gibberellin auf das Wachstum von Gewebekulturen des Callus von Daucus carota. Mit 1 Textabbildung 70

HAUPT, W., Über den Primärvorgang bei der polarisierenden Wirkung des Lichtes auf keimende Equisetum-Sporen. Mit 11 Textabbildungen 74

BAUER, A., Die Konstanz des Chlorophyllgehaltes bei Laubblättern im Laufe eines Tages. Mit 2 Textabbildungen 84

LANDMANN, W., Vergleichende Untersuchungen an meiotischen und endomitotischen Chromomeren von Gentiana cruciata L. Kurze Mitteilung. Mit 1 Textabbildung 99

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Handelsnamen, Warenbezeichnungen usw. in dieser Zeitschrift berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, daß solche Namen im Sinne der Warenzeichen- und Markenschutzgesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt werden dürften.

Planta, Bd. 51, S. 1—29 (1958)

Aus dem Botanischen Institut der Universität Tübingen

BLÜHHEMMUNG BEI KURZTAGPFLANZEN DURCH HELLROT- UND DUNKELROTLICHT IN DER PHOTO- UND SKOTOPHILEN PHASE

Von

WALTER KÖNITZ

Mit 21 Textabbildungen

(Eingegangen am 23. September 1957)

I. Einleitung

In den letzten Jahren sind zahlreiche Versuche mit Farblicht enger Wellenlängenbereiche bei Lang- und Kurztagpflanzen gemacht worden. Gleichzeitig wurden damit die experimentellen Einrichtungen für die Lichtquellen und Farbfilter immer weiter verbessert. Heute ist es möglich, in Klimakammern unter konstanten Bedingungen von Temperatur und Feuchtigkeit auch konstante Lichtbedingungen zu schaffen und dabei Farblicht relativ enger Bereiche hoher Intensität zu verwenden. Hierdurch können auch an höheren Pflanzen Experimente unter ausschließlich künstlicher Beleuchtung durchgeführt werden.

Aus der Vielfalt der Arbeiten zeichnen sich zwei Wege ab. Bei Kurztagpflanzen wurde einerseits etwa in der Mitte der Dunkelperiode kurzfristig Farblicht gegeben und ein Aktionsspektrum der Blühhemmung durch dieses farbige Störlicht aufgestellt (PARKER et al. 1946), andererseits wurde anschließend an die Hauptlichtperiode eine Farblichtperiode meist geringerer Intensität angeschlossen und auch hier geprüft, welche Farbbereiche die Ausbildung der Infloreszenz fördern oder hemmen (WASSINK et al. 1951; vgl. hierzu auch die Zusammenfassungen von STOLWIJK 1954a und von WASSINK 1954, sowie die dort angegebene Literatur).

Besonders durch die letztgenannten Arbeiten kommen die Verfasser zu dem Ergebnis, daß die einzelnen Farblichtbereiche eine ganz verschiedenartige Wirkung hervorrufen, je nachdem, ob sie als Störlicht während der Mitte der Dunkelperiode oder anschließend an eine längere oder kürzere Hauptlichtperiode den Versuchspflanzen geboten werden. Aber schon bei Veränderung der Hauptlichtperiodenlänge zeigen die Versuchspflanzen in den einzelnen Farblichtbereichen verschiedene Reaktion in Hinblick auf Hemmung oder Förderung der Blütenbildung.

Nun ist ebenfalls seit mehreren Jahren bekannt, daß sich Kurztagpflanzen vom Lichtbeginn bis etwa 11 Std danach in einer photophilen und daran anschließend etwa 12 Std lang in einer skotophilen Phase

befinden (BÜNNING 1946). Dieser rhythmische Phasenverlauf ist endogen und wird durch den Lichtreiz zu Beginn der Hauptlichtperiode reguliert. So kann unter anderem durch die Blattbewegung die zeitliche Folge dieser endogenen Rhythmik registriert werden (BÜNNING 1944a; 1944b; 1956 und die dort angegebene Literatur).

In der vorliegenden Arbeit soll nun untersucht werden, ob und wieweit eine Beziehung zwischen dem Verlauf der photophilen bzw. skotophilen Phase und der Blühhemmung durch die antagonistischen Bereiche von Hell- und Dunkelrotlicht besteht.

II. Material

Für die Versuche wurde die Kurztagpflanze *Chenopodium amaranticolor* (Coste et Reynier) ausgewählt, da bei ihr unter konstanten Bedingungen die Blütenausbildung nur wenig variiert und zur Blühinduktion eine relativ geringe Zahl von Kurztagcyclen nötig sind.

Als Saatgut wurde nur solches benutzt, das an einem Tage, am 14. 10. 55, von der Mutterpflanze geerntet worden war, um Fehlerquellen auszuschalten, die durch uneinheitliche Samenreife und deren Auswirkungen auf den Photoperiodismus entstehen könnten (LONA 1955)[1]. Das Saatgut wurde in einer Kühltruhe bei plus 5° C gelagert (ZEEVAART 1956)[2]; es zeigte noch nach 18 Monaten eine Keimfähigkeit von 92%.

Ausgesät wurde in Tonschalen mit Gartenerde; nach 6—7 Wochen wurden die jungen Pflanzen in Tontöpfe mit Gartenerde verpflanzt, jeweils eine Pflanze in einem Topf von 8 cm ⌀. Vom Tage der Aussaat an standen die Pflanzen im Gewächshaus unter Dauerlicht, um jede Blühinduktion zu verhindern; tagsüber erhielten sie im Gewächshaus normales Sonnenlicht, nachts dienten 40 Watt Leuchtstoffröhren der Firma Osram in einer Kombination von HNT:HNW wie 2:1 als Lichtquellen (Abb. 1). Hierdurch entsprach das Emissionsspektrum der Röhren etwa dem sichtbaren Bereich des Sonnenlichtes[3]. Die Lichtintensität betrug nachts in Pflanzenhöhe 8000—10000 erg/cm² · sec. Zu Beginn jeder Versuchsserie waren die Pflanzen stets 10 Wochen alt, hatten eine Höhe von 12—15 cm, je nach Jahreszeit, und etwa 8—10 vollausgebildete Laubblätter.

Chenopodium amaranticolor blieb im Dauerlicht stets rein vegetativ — über einen Zeitraum von 18 Monaten hin — und zeigte auch keine Übergänge vom vegetativen zum reproduktiven Stadium, z. B. Verlaubungserscheinungen der Infloreszenz.

Die Versuche wurden von April bis November 1956 und März bis Juli 1957 ausgeführt, da während der Wintermonate die Temperatur im Gewächshaus und beim Transport vom Gewächshaus in die Klimaräume tiefer war als die normale Schwankungsbreite im Gewächshaus selbst.

III. Methodik

Die Versuche zur Blühinduktion durch Kurztag bzw. deren Hemmung wurden in Klimakammern durchgeführt, die es ermöglichten, Temperatur, Feuchtigkeit,

[1] Briefliche Mitteilung.

[2] Mündliche Mitteilung.

[3] Für die Überlassung der Emissionskurven der Leuchtstoffröhren danke ich der Firma Osram, Berlin.

Lichtintensität und -dauer, konstant zu halten. Bei allen Versuchen betrug die Temperatur 20° C (± 0,5°), die relative Luftfeuchtigkeit 85% (± 5%). In den Klimakammern wechselten eine Hauptlichtperiode mit einer Dunkelperiode jeweils einmal innerhalb von 24 Stunden.

Als Lichtquelle für die Hauptlichtperiode dienten 40 Watt Leuchtstoffröhren der Firma Osram in einer Kombination von HNT:HNW wie 2:1, wodurch etwa die Qualität des sichtbaren Bereichs des Sonnenlichtes erreicht wird, und zwar mit einer Intensität von 40000 erg/cm² · sec in Höhe des obersten voll ausgebildeten Laubblattes. Abb. 1 zeigt das Emissionsspektrum dieser Leuchtstoffröhrenkombination. Dabei wurde darauf geachtet, daß die obersten Laubblätter aller Pflanzen gleichen Abstand von der Lichtquelle hatten. Zunächst wurden Versuche angesetzt, bei denen die Pflanzen während der Dunkelperiode kurzfristig Farblicht erhielten,

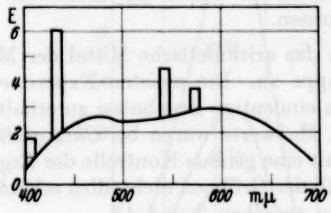


Abb. 1

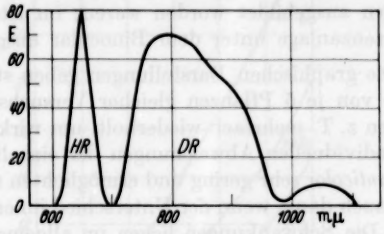


Abb. 2

Abb. 1. Emissionsspektrum von Osram Leuchtstoffröhren einer Kombination HNT:HNW wie 2:1. *Ordinate:* Relative Energie; *Abszisse:* Wellenlänge in mμ

Abb. 2. Spektrale Energieverteilung der Leuchtstoffröhre Philips TL 40 W/15 (HR = Hellrot) und einer Wasser- und Glasfilterkombination BG 3 + OG 3 (DR = Dunkelrot). *Ordinate:* Relative Energie; *Abszisse:* Wellenlänge in mμ

späterhin wurde die Hauptlichtperiode durch Einschaltung von Farblicht unterbrochen, statt Weißlicht in der Hauptlichtperiode also zeitweilig Farblicht gegeben.

Als Störlicht wurden Hellrot (610—690 mμ) und Dunkelrot (705—980 mμ) benutzt. Als Lichtquelle für Hellrot dienten 40 Watt Leuchtstoffröhren der Firma Philips (TL 40 W/15), deren Emissionskurve aus Abb. 2 (HR = Hellrot) ersichtlich ist. Diese Leuchtstoffröhre ist frei von dunkelrotem Licht, ihr Emissionsmaximum liegt bei 660 mμ; daher eignet sie sich gut für diese Versuchsanordnung[1]. Als Dunkelrotquelle dienten Philips Attralux-Strahlerlampen von 150 Watt, denen als Wärmefilter eine 10 cm dicke Wasserschicht vorgeschaltet war, sowie Glasfilter (BG 3 und OG 3, jedes 15 × 15 cm und 2 mm dick) der Firma Schott & Gen., Mainz, zur Abgrenzung gegenüber dem Hellrotbereich. Die spektrale Energieverteilung des durch Wasser- und Glasfilter begrenzten Spektrums zeigt ebenfalls Abb. 2 (DR = Dunkelrot).

Diese Glas- und Wasserfilterkombination wurde mit einem Spektrophotometer mit Monochromator M 4 Q der Firma Zeiss ausgemessen. Die beiden Farblichtbereiche, Hell- und Dunkelrot, wurden energiegleich eingestellt. Die auf das oberste vollentwickelte Laubblatt der Versuchspflanze eingestrahlte Intensität betrug in beiden Farbbereichen 16000 erg/cm² · sec; wobei sich der Dunkelrotanteil allerdings über einen wesentlich breiteren Wellenbereich erstreckte. Die Intensitätsmessungen erfolgten mit einer Thermosäule in Verbindung mit einem Multiflexgalvanometer MGF 0 der Firma Lange, Berlin, nachdem eine Eichung mittels einer Eichlampe derselben Firma durchgeführt worden war.

[1] Die Ausmessung der Philips Leuchtstoffröhre übernahm freundlicherweise das Laboratoire central d'électricité in Brüssel.

Alle Experimente dauerten — nach den Ergebnissen der Vorversuche — 10 Tage, d. h. die Versuchspflanzen erhielten 10 Kurztagcyclen und wurden danach sofort wieder ins Gewächshaus zurücktransportiert und unter Dauerlicht bis zur Auswertung gehalten, um jede weitere Induktion zu vermeiden, sofern nicht sofort am Versuchsende ausgewertet worden war.

Ausgewertet wurde unter dem Binocular bei 15facher Lupenvergrößerung, jeweils 10 und 15 Tage nach Versuchsbeginn, also sofort am Versuchsende oder 5 Tage danach; teilweise wurden weitere Gruppen noch später ausgewertet, stets aber blieben aus jeder Gruppe einzelne Pflanzen längere Zeit im Gewächshaus unter Dauerlicht stehen, um späterhin immer wieder nachgeprüft zu werden. Bei der Auswertung wurde der Vegetationspunkt freipräpariert und festgestellt, ob die Versuchspflanze vegetativ geblieben war, oder ob am Vegetationskegel Blütenanlagen ausgebildet worden waren; im letzteren Falle wurde die Größe der Infloreszenzanlage unter dem Binocular ausgemessen.

Die graphischen Darstellungen geben stets das arithmetische Mittel der Meßwerte von je 5 Pflanzen gleicher Versuchsgruppe an. Die meisten Experimente wurden z. T. mehrfach wiederholt, um wirklich eindeutige Ergebnisse zu erhalten. Die individuellen Abweichungen der einzelnen Meßwerte waren bei *Chenopodium amaranticolor* sehr gering und ermöglichten somit eine genaue Kontrolle der Ergebnisse auch dann, wenn der Unterschied innerhalb der Gruppen nicht allzu erheblich war. Die Schwankungen liegen im allgemeinen zwischen 3 und 4%.

IV. Vorversuche

Die Experimente wurden in Klimakammern durchgeführt, in denen Leuchtstoffröhren als Lichtquellen dienten. Die maximal erreichbare Lichtintensität betrug in einem Abstand von der Lichtquelle, der für die Pflanzen nicht schädigend war, 40000 erg/cm² · sec. Da die Infloreszenzgröße der Pflanzen von der gebotenen Lichtintensität und der Temperatur während der Hauptlichtperiode abhängt (GARNER and ALLARD 1920. 1923), wurde geprüft, welche Tageslänge unter diesen konstanten Bedingungen von Temperatur und Lichtintensität optimal war und welche Cyclenzahl für eine eindeutige Auswertung der Versuche genügte.

1. Optimale Tageslänge

Beim ersten Vorversuch sollte die optimale Tageslänge ermittelt werden. Dazu erhielten die einzelnen Gruppen innerhalb eines 24stündigen Cyclus eine verschieden lange Hauptlichtperiode, die zwischen 1—20 Std jeweils um eine volle Stunde variierte, und zwar 10 Tage lang, also in 10 Induktionscyclen. Das Ergebnis zeigt Abb. 3. Die Auswertung erfolgte 10, 15, 20 und 40 Tage nach Versuchsbeginn. Man sieht, daß eine *Tageslänge von 9,5 Std optimal* ist. Alle späteren Störlichtversuche während der Dunkelperiode wurden daher bei einer Tageslänge von 10 Std, also etwa optimalen Bedingungen, und zur Kontrolle auch bei einer Tageslänge von 4 Std, also unteroptimal, durchgeführt. Oberhalb einer Tageslänge von 16 Std unterblieb die Ausbildung der Infloreszenz,

die Pflanzen blieben immer vegetativ. Unter diesen Bedingungen betrug die kritische Tageslänge im Weißlicht 16 Stunden.

Ein weiteres Experiment zeigte, daß Pflanzen nach 10 Tagen Dauerdunkel ebenfalls vegetativ waren und weiterhin blieben. Länger als 10 Tage Dauerdunkel vertrugen die Pflanzen nicht, sondern gingen dabei ein. Somit erfolgte bei *Chenopodium amaranticolor* im Dauerdunkel keine Blühinduktion.

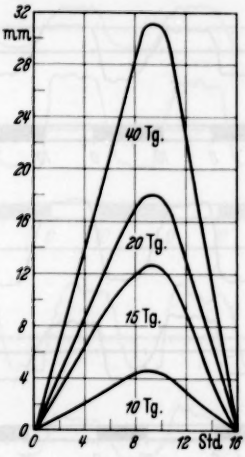


Abb. 3

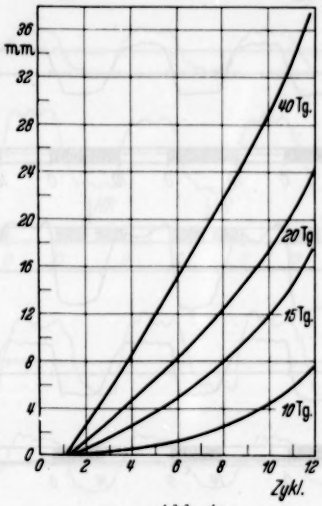


Abb. 4

Abb. 3. Abhängigkeit der Infloreszenzgrößen von der Tageslänge bei 10 Induktionscyclen. Auswertung 10, 15, 20 und 40 Tage nach Versuchsbeginn. *Ordinate:* Infloreszenzgröße in Millimetern; *Abszisse:* Tageslänge in Stunden

Abb. 4. Abhängigkeit der Infloreszenzgrößen von der Induktionscyclenzahl bei einer Tageslänge von 10 Std. Auswertung 10, 15, 20 und 40 Tage nach Versuchsbeginn. *Ordinate:* Infloreszenzgröße in Millimetern; *Abszisse:* Zahl der Induktionscyclen

2. Erforderliche Anzahl von Induktionscyclen

Es wurde geprüft, wieviele Induktionscyclen bei einer Tageslänge von 10 Std nötig sind, um gut auswertbares Versuchsmaterial zu erhalten. Die Cyclenzahl, mit der die einzelnen Gruppen induziert wurden, stieg von 1 bis zu 12 Cyclen an; das Ergebnis zeigt Abb. 4. Die Auswertung erfolgte wieder 10, 15, 20 und 40 Tage nach Versuchsbeginn. Hierbei zeigte sich, daß man schon mit 3—5 Induktionscyclen hätte arbeiten können, wenn dann ebenfalls erst nach 10 Tagen ausgewertet worden wäre. Dennoch wurden bei allen späteren Experimenten 10 Induktionscyclen gewählt und die erste Auswertung sofort danach vorgenommen, weil dadurch Fehlerquellen durch den Transport von der Klimakammer zum Gewächshaus und durch die Schwankungen von Temperatur, Feuchtigkeit und Lichtintensität im Gewächshaus zwischen Versuchsbeginn und erster Auswertung vermieden wurden.

3. Verlauf der endogenen Rhythmik

Die tageszeitliche Lage der photo- und skotophilen Phase und dadurch der Verlauf der endogenen Rhythmik wird unter anderem durch die Blattbewegung kenntlich gemacht (BÜNNING 1953). *Chenopodium amaranticolor* besitzt eine deutlich ausgeprägte Blattbewegung, obwohl keine Gelenke vorhanden sind. Zur Nacht hebt die Pflanze die Blätter bis fast zur Senkrechten an, zum Tage senkt sie sie wieder bis zur Waagerechten herab. Es wurden nun in der Klimakammer Blattbewegungen unter den Bedingungen registriert, unter denen die Versuchspflanzen später induziert werden sollten; also im 10stündigen Kurztag bei einer

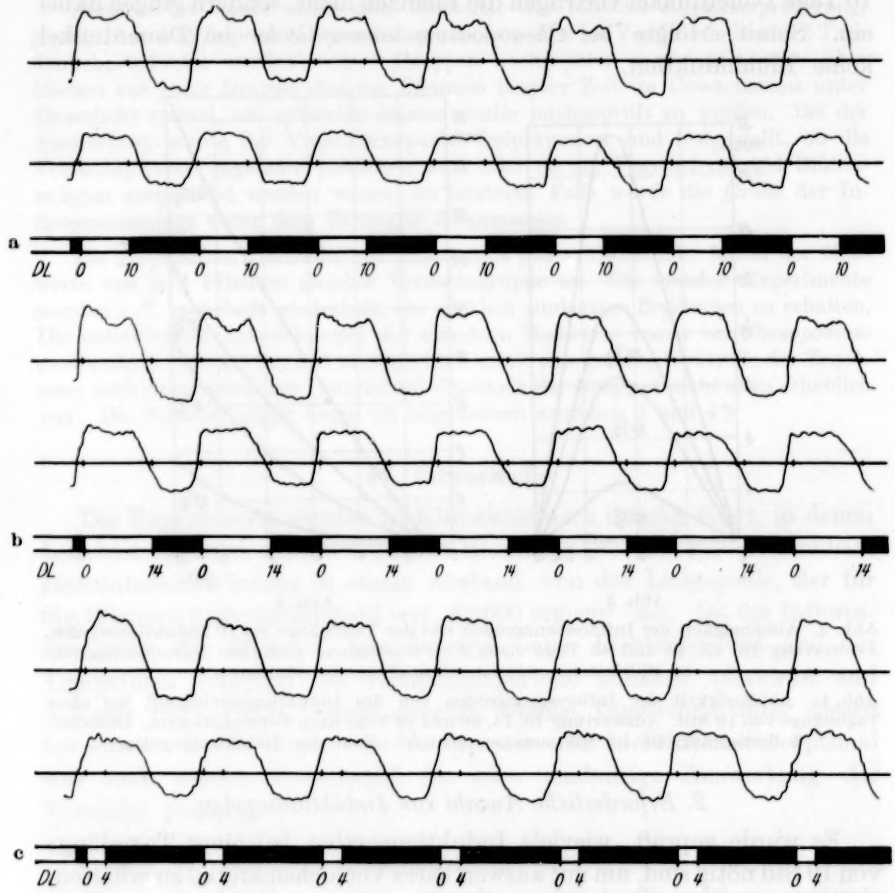


Abb. 5a—c. Verlauf der Blattbewegung bei verschiedener Tageslänge im 24stündigen Cyclus. a Bei 10 Std Licht, b bei 14 Std, c bei 4 Std Licht täglich. *Ordinate:* Anstieg der Kurve bedeutet Blattsenkung zur Tagesstellung, damit Beginn der photophilen Phase, ein Abfall der Kurve bedeutet Blatthebung zur Nachtstellung, also Beginn der skotophilen Phase. *Abszisse:* Zeit in Stunden. (Schwarze Felder = Dunkelheit, weiße Felder = Licht, DL = Dauerlicht)

Lichtintensität von 40000 erg/cm² · sec während der Hauptlichtperiode. Dies zeigt Abb. 5a. Ein Ansteigen der Kurve bedeutet Blattsenkung, also den Beginn der photophilen Phase, während der Anfang der skotophilen Phase durch den Abfall der Kurve angezeigt wird. Hiernach setzt die photophile Phase etwas mehr als eine Stunde vor Beginn der Hauptlichtperiode ein und endet kurz vor der 11. Std nach Lichtbeginn, einerlei ob dann noch Licht gegeben wird oder schon Dunkelheit

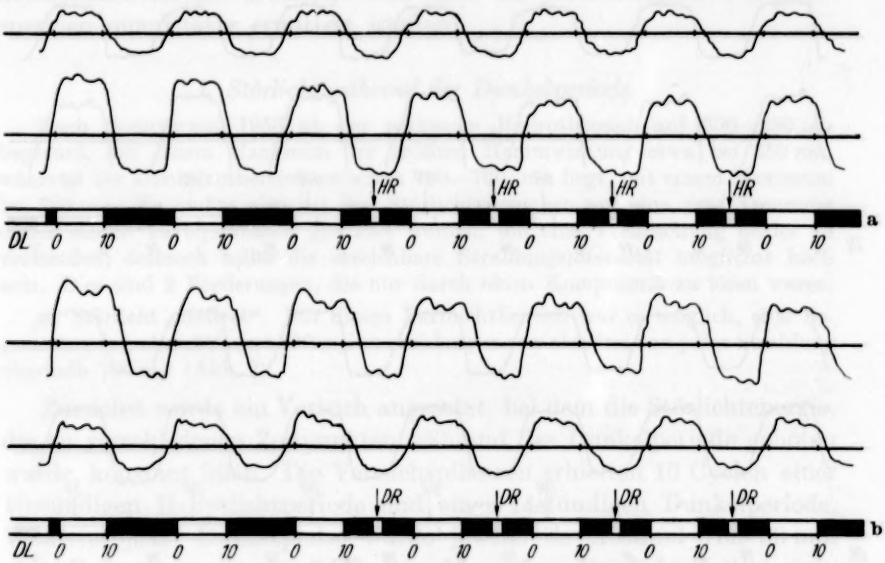


Abb. 6a u. b. Verlauf der Blattbewegung bei einer Tageslänge von 10 Std im 24stündigen Cyclus mit 2 Std Störlicht in der Mitte der Dunkelphase. a Hellrotes (HR), b dunkelrotes (DR) Störlicht. *Ordinate* und *Abszisse* s. Abb. 5

herrscht. Als Gegenkontrollen wurden Blattbewegungen bei 14- und 4stündiger Tageslänge innerhalb 24stündiger Cyclen durchgeführt (Abb. 5b und c). Stets wurde zwischen Dauerlicht (DL) und Beginn der ersten Lichtperiode eine 2stündige Dunkelphase eingeschalte†.

Da die Störlichtversuche während der Dunkelperiode durchgeführt werden sollten, wurde auch hier zunächst an Blattbewegungen untersucht, ob Störlicht von 16000 erg/cm² · sec den Verlauf der photo- und skotophilen Phase verändert. Wie Abb. 6 zeigt, führte weder hell- noch dunkelrotes Störlicht obiger Intensität, 2 Std lang in der Mitte der Dunkelperiode gegeben, zu Veränderungen in der Blattbewegung.

Ebenso wurde die Hauptlichtperiode durch Einschaltung von Farblicht unterbrochen und dabei die Blattbewegung registriert. Wiederum zeigten die Versuchspflanzen, die hell- und dunkelrotes Störlicht von 4 Std Dauer bei einer Intensität von 16000 erg/cm² · sec in der Mitte

der Hauptlichtperiode statt Weißlicht erhielten, keine Veränderung der Hebungs- und Senkungsphasen bei der Blattbewegung (Abb. 7).

Bei allen Experimenten standen die Pflanzen nach dem Transport vom Gewächshaus in die Klimaräume dort etwa 2 Std vor Versuchsbeginn im Dunkeln. Die damit verbundene Veränderung der Temperatur und Luftfeuchtigkeit, sowie der Übergang von Dauerlicht zu Dunkelheit genügten, um bei erneutem Lichtbeginn die endogene

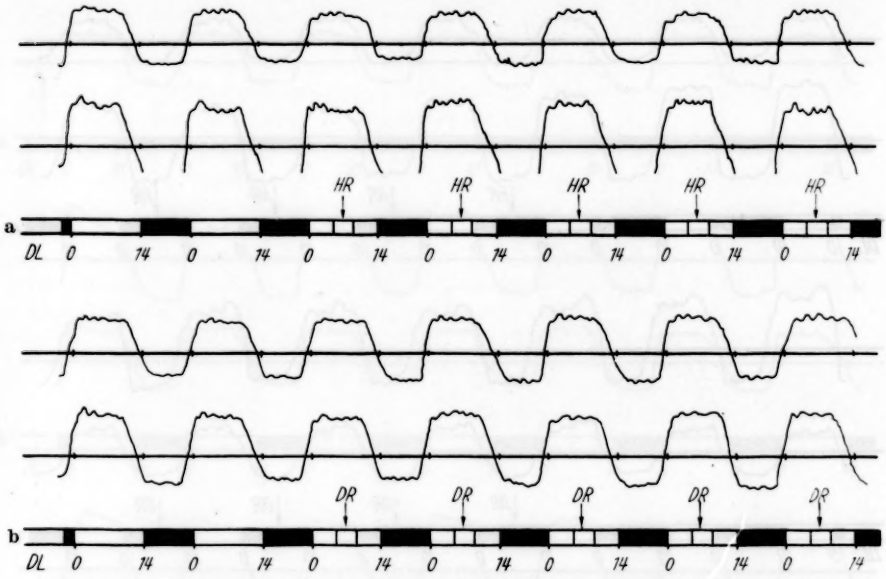


Abb. 7 a u. b. Verlauf der Blattbewegung bei einer Tageslänge von 14 Std im 24stündigen Cyclus mit 4 Std Störlicht in der Mitte der Lichtphase. a Hellrotes (HR), b dunkelrotes (DR) Störlicht. *Ordinate* und *Abszisse:* s. Abb. 5

Rhythmik zu starten. Jene Dunkelzeit ist aber zu kurz, um etwaige Dunkelreaktionen der Blühinduktion wirksam werden zu lassen. Auch diese aus Versuchen mit Blühinduktion gewonnenen Ergebnisse wurden durch Blattbewegung geprüft und bestätigt. Bei Pflanzen, die von der Aussaat an ununterbrochen im Dauerlicht im Gewächshaus standen, wurde keine rhythmische Blattbewegung beobachtet; lediglich Veränderungen je nach Sonneneinstrahlung und Temperatur traten auf, die aber keine Periodizität aufwiesen. Dagegen genügten die oben erwähnten Veränderungen, um eine rhythmische Blattbewegung hervorzurufen.

V. Hauptversuche

Seit den Arbeiten von HAMNER and BONNER (1938), RAZUMOV (1941) und ELMSWELLER et al. (1941) ist es bekannt, daß Störlicht während der Dunkelperiode bei Kurztagpflanzen blühhemmend wirkt. Durch PARKER et al. (1946) erkannte man, daß besonders Hellrot (600—700 mμ) eine starke Hemmung ausübt, während

das dunkelrote Licht (700—800 mμ) die Infloreszenzausbildung nicht beeinträchtigt. Diese beiden Farblichtbereiche zeigen ferner eine antagonistische Wirkung derart, daß die Hellrothemmung durch anschließend gegebenes Dunkelrot wieder aufgehoben werden kann (Borthwick et al., 1952). Dabei wurde festgestellt, daß die Störlichtwirkung innerhalb von 2 Std um die Mitte der Dunkelperiode am stärksten ist. Daher beschränken sich die meisten Arbeiten auf jenen Zeitraum (vgl. z. B. Salisbury and Bonner 1956).

In meinen Versuchen sollten die Hemmwirkung in den einzelnen Zeitabschnitten der Dunkelperiode und die erforderlichen Störlichtenergien quantitativ ermittelt werden.

1. Störlicht während der Dunkelperiode

Nach Borthwick 1956 ist der wirksame Hellrotbereich auf 600—680 mμ begrenzt, mit einem Maximum der größten Hemmwirkung etwa bei 650 mμ, während der Dunkelrotbereich zwischen 700—760 mμ liegt, mit einem Maximum bei 735 mμ. Es mußte also bei den Störlichtversuchen auf eine gute Trennung dieser beiden Farbqualitäten geachtet werden, um eine Vermischung beider zu vermeiden; dennoch sollte die erreichbare Strahlungsintensität möglichst hoch sein. Dies sind 2 Forderungen, die nur durch einen Kompromiß zu lösen waren.

a) Störlicht „Hellrot". Für diesen Farblichtbereich war es möglich, eine Begrenzung zwischen 610 und 690 mμ zu erzielen; er war also frei von jeder Strahlung oberhalb 700 mμ (Abb. 2).

Zunächst wurde ein Versuch angesetzt, bei dem die Störlichtenergie, die zu verschiedenen Zeitpunkten während der Dunkelperiode geboten wurde, konstant blieb. Die Versuchspflanzen erhielten 10 Cyclen einer 10stündigen Hauptlichtperiode und einer 14stündigen Dunkelperiode. Während jeder Dunkelphase wurde jeweils im Abstand von 30 min einer Versuchsgruppe von 5 Pflanzen *15 min lang* Störlicht Hellrot einer Intensität von 16000 erg/cm^2 · sec gegeben, also einer Hellrotenergie von 14400 Kiloerg/cm^2. Dauerte die Dunkelperiode von 0—14 Uhr, so erhielt die erste Gruppe um 1^{15} Uhr Störlicht, die zweite Gruppe um 1^{30} Uhr, die dritte um 2^{00} Uhr und so fort bis 13^{00} Uhr alle 30 min. Als Kontrolle diente eine Gruppe mit einer 14stündigen Dunkelphase ohne Störlicht. Am Versuchsende, also 10 Tage nach Versuchsbeginn, wurde die erste Auswertung vorgenommen, weitere 5 Tage danach die zweite. Das Ergebnis dieser Versuchsreihe ist in Abb. 8 dargestellt. Es ergab sich, daß gegenüber den Kontrollen ohne Störlicht zu jeder Zeit während der Dunkelphase hellrotes Licht hemmend auf die Blütenbildung wirkt, aber in verschiedener Stärke. Zu Beginn und am Ende der Dunkelperiode schwächer, zwischen der 4. und 9. Std aber hemmte Hellrot dieser Energie die Infloreszenzausbildung völlig.

Um nun genauer festzustellen, wo das Maximum der Hemmung liegt, und wie weit eine Veränderung der Störlichtenergie zu einer Beeinflussung der Infloreszenzgröße führt, wurde ein weiteres Experiment angesetzt. Wieder erhielten die Versuchspflanzen eine 14stündige Dunkelperiode

und eine 10stündige Hauptlichtperiode in 10 Induktionscyclen. Während der Dunkelperiode von 0—14 Uhr wurde diesmal zwischen 3^{00}—4^{15} Uhr und zwischen 9^{00}—10^{20} Uhr alle 15 min jeweils eine Gruppe von 5 Pflanzen mit Hellrot einer Intensität von 16000 erg/cm² · sec *10 min lang*, also mit einer Energie von 9600 Kiloerg/cm² gestört. Die Auswertung erfolgte wieder 10 Tage nach Versuchsbeginn, also am Versuchsende, sowie 5 Tage später. Die Ergebnisse dieser Versuchsserie sind in Abb. 9 dargestellt.

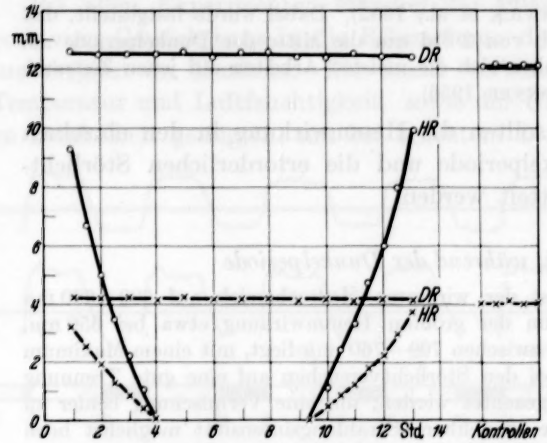


Abb. 8. Infloreszenzausbildung bei einer Störlichtenergie von 14400 Kiloerg/cm², zu verschiedenen Zeiten während der 14stündigen Dunkelperiode in 10 Cyclen gegeben. *Ordinate:* Infloreszenzgrößen in Millimetern; *Abszisse:* Zeit seit Beginn der Dunkelphase in Stunden. Auswertung: 10 Tage ×——× und 15 Tage o——o nach Versuchsbeginn. HR = hellrotes, DR = dunkelrotes Störlicht. Kontrollen: ohne Störlicht in der Dunkelphase

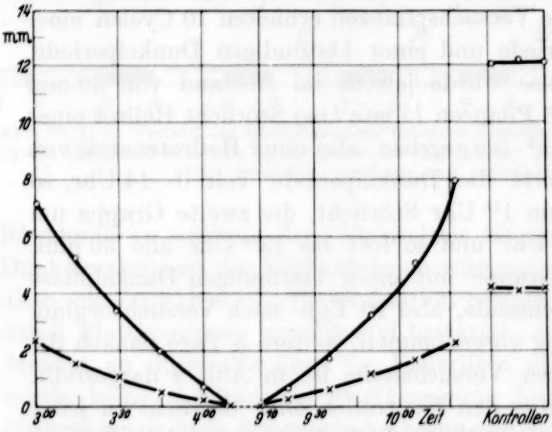


Abb. 9. Infloreszenzanlage bei einer Störlichtenergie Hellrot von 9600 Kiloerg/cm², zu verschiedenen Zeiten während der 14stündigen Dunkelperiode in 10 Cyclen gegeben. *Ordinate:* Infloreszenzgrößen in Millimetern. *Abszisse:* Zeit seit Beginn der Dunkelphase in Stunden. Auswertung: 10 Tage ×——× und 15 Tage o——o nach Versuchsbeginn. Kontrollen: ohne Störlicht in der Dunkelperiode

Hierbei ergab sich, daß das *Maximum der Hemmung etwa 6,75 Std nach Beginn der Dunkelperiode liegt*. Es zeigte sich ferner, daß durch eine Erhöhung der Störlichtenergie eine stärkere Hemmwirkung erreichbar ist.

Diese Versuche deuten daraufhin, daß es möglich sein müßte, zu jeder Zeit der Dunkelperiode mit genügend hoher Hellrotenergie eine völlige Hemmung der Infloreszenzausbildung zu erreichen. Will man diese Hemmwirkung aber nicht nur qualitativ, sondern auch quantitativ untersuchen, so darf die Hemmung nur bis zu einem gut vergleichbaren Stadium erfolgen. Hierzu wurde in allen folgenden Experimenten das Stadium gewählt, bei dem die Pflanze gerade noch

vegetativ bleibt, oder anders gesagt, man stellte die Störlichtenergie fest, die gerade ausreicht, um die Infloreszenzausbildung der Versuchspflanze völlig zu unterbinden, während eine geringe Verminderung dieser Energie die Anlage einer Infloreszenz schon ermöglichte. Dieses Stadium erhielt die Bezeichnung: „Grenzwert der Störlichtenergie Hellrot".

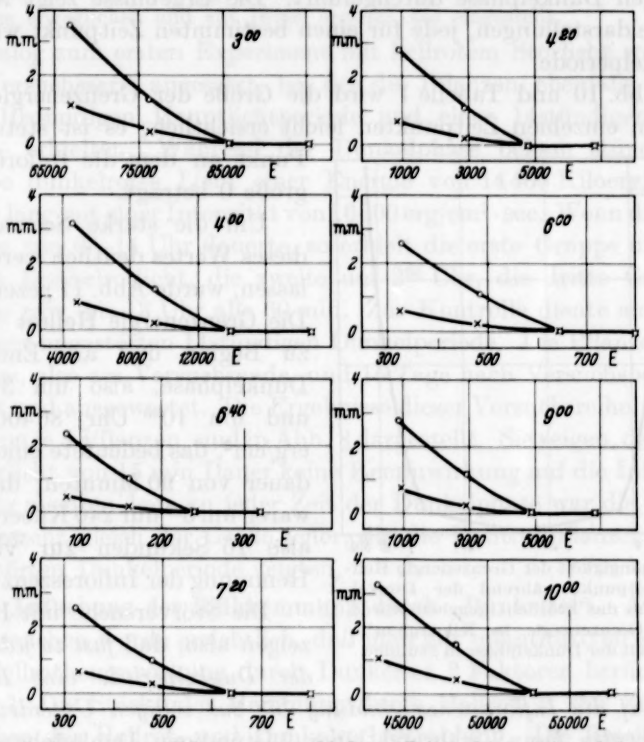


Abb. 10. Infloreszenzausbildung zu verschiedenen Zeitpunkten während der 14stündigen Dunkelperiode bei variierender Störlichtenergie Hellrot. *Ordinate:* Infloreszenzgröße in Millimetern; *Abszisse:* Störlichtenergie Hellrot in Kiloerg/cm². Auswertung: 10 Tage ×——× und 15 Tage o——o nach Versuchsbeginn

Wurde in den oben genannten Versuchen die Störlichtenergie zu den verschiedenen Zeitpunkten während der Dunkelperiode in konstanter Dosierung geboten, so mußte nun zwecks Feststellung dieses Grenzwertes Hellrot zu bestimmten Zeitpunkten der Dunkelphase die Störlichtenergie solange verändert werden, bis die Pflanzen gerade vegetativ blieben.

Dazu waren mehrere Teilversuche nötig. Dauerte die Dunkelperiode von 0—14 Uhr, so wurden um 3^{00}, 4^{00}, 4^{20}, 6^{00}, 6^{40}, 7^{20}, 9^{00} und 10^{00} Uhr Versuchsserien durchgeführt, bei denen die einzelnen Gruppen eine verschieden hohe Störlichtenergie Hellrot erhielten. Dabei war die Erhöhung der Energie nur durch eine Verlängerung der Störlichtdauer

möglich. Die angegebenen Zeitpunkte stellen jeweils die Halbzeit der Störlichtdauer dar (Tabelle 1). Die Lichtintensität wurde bei allen Experimenten konstant gehalten. Somit läßt sich nicht nur die Störlichtenergie, sondern auch die Stördauer vergleichen. Beide geben ein Maß für die Hemmwirkung. Diese Versuchsserie wurde mit 10 Cyclen einer 14stündigen Dunkelphase durchgeführt. Die Ergebnisse zeigt Abb. 10 in 8 Einzeldarstellungen, jede für einen bestimmten Zeitpunkt während der Dunkelperiode.

Aus Abb. 10 und Tabelle 1 wird die Größe der Grenzenergie Hellrot zu den einzelnen Zeitpunkten leicht ersichtlich; es ist stets jener Punkt an dem die Infloreszenzgröße 0 beträgt.

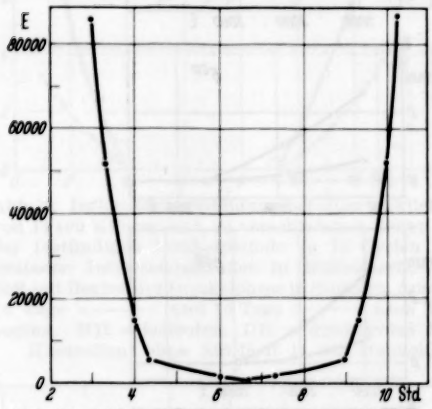


Abb. 11. Abhängigkeit der Grenzenergie Hellrot vom Zeitpunkt während der Dunkelphase, an dem das Störlicht gegeben wurde. *Ordinate:* Grenzenergie in Kiloerg/cm². *Abszisse:* Zeit der Dunkelphase in Stunden

Um die starke Schwankung dieses Wertes deutlich werden zu lassen, wurde Abb. 11 gezeichnet. Die Grenzenergie Hellrot betrug zu Beginn und am Ende der Dunkelphase, also um 3^{00} Uhr und um 10^{20} Uhr, 86400 Kiloerg/cm², das bedeutete eine Stördauer von 90 Minuten; dagegen waren um 6^{40} nur 240 Kiloerg/cm², also 15 Sekunden zur völligen Hemmung der Infloreszenz nötig.

Die Störversuche mit Hellrot zeigen also, daß *fast zu jeder Zeit der Dunkelperiode eine Hemmwirkung auf die Infloreszenzausbildung bis zur völligen Unterdrückung ausgeübt werden kann*; während einer 14stündigen Dunkelphase hier zwischen der 3.—10,5. Std nach Beginn derselben. Ein Minimum der nötigen Grenzenergie tritt dabei 6,75 Std nach Beginn der Dunkelperiode auf, also nicht in deren Mitte. Symmetrisch zu diesem Minimum steigt die Größe der Grenzenergie zum Anfang und zum Ende der Dunkelphase an, wie Abb. 11 zeigt.

b) Störlicht „Dunkelrot". Nachdem es sich ergeben hatte, welche starke Hemmwirkung hellrotes Licht in der Dunkelperiode ausübt, war es nötig, den Dunkelrotbereich so abzugrenzen, daß er völlig frei von Hellrot blieb; denn nur so lassen sich die Ergebnisse auch wirklich dem dunkelroten Licht allein zuordnen. Jede Verunreinigung muß zu einer Beeinträchtigung der Störlichtversuche mit Dunkelrot führen.

Diese Abgrenzung geschah mittels Schottfilter BG 3 und OG 3, die kombiniert erst oberhalb 705 mμ Licht durchließen, also jede Strahlung unterhalb 700 mμ absorbierten. Die Wärmestrahlung wurde durch eine 10 cm starke Wasserschicht

abgefangen, dadurch trat im Dunkelrotbereich keine stärkere Erwärmung auf als im Hellrotbereich. Einige Experimente ohne diesen Wärmeschutz zeigten recht unklare Ergebnisse, die teilweise das Gegenteil der späteren Versuche aussagten. Diese Temperaturerhöhung könnte direkte Schädigung bedeuten oder eine Veränderung der zeitlichen Lage der photo- und skotophilen Phase hervorrufen, wie es eine Arbeit von SCHWEMMLE 1957 zeigt. Die Lichtintensität des durch Schottfilter und Wasser begrenzten Bereiches (Abb. 2) wurde der des Hellrotbereiches angeglichen und auf 16000 erg/cm² · sec eingestellt.

Analog zum ersten Experiment mit hellrotem Störlicht wurde jetzt eine Versuchsserie angesetzt, bei der die Pflanzen ebenfalls 10 Cyclen einer 10stündigen Hauptlichtperiode und einer 14stündigen Dunkelperiode erhielten. Während der Dunkelphase bekam stündlich eine Gruppe dunkelrotes Licht einer Energie von 14400 Kiloerg/cm², also 15 min lang mit einer Intensität von 16000 erg/cm² · sec. Wenn die Dunkelperiode von 0—14 Uhr dauerte, so erhielt die erste Gruppe um 1^{00} Uhr 15 min Dunkelrotlicht, die zweite um 2^{00} Uhr, die dritte Gruppe um 3^{00} Uhr usw. bis 13 Uhr alle 60 min. Zur Kontrolle diente eine Gruppe mit einer ungestörten 14stündigen Dunkelperiode. Die Pflanzen wurden 10 Tage, also am Versuchsende, und 15 Tage nach Versuchsbeginn präpariert und ausgewertet. Die Ergebnisse dieser Versuchsreihe, als Mittelwert von je 5 Pflanzen, sind in Abb. 8 dargestellt. Sie zeigen, daß Dunkelrotstörlicht von 15 min Dauer keine Hemmwirkung auf die Infloreszenzbildung ausübt; denn zu jeder Zeit der Dunkelphase war die Größe der Infloreszenz gleich der Größe jener, die die Kontrollpflanzen mit einer ungestörten Dunkelperiode zeigten.

c) Aufhebung der Blühhemmung durch „Dunkelrot". Aus einigen Vorversuchen wurde ersichtlich, daß man zur quantitativen Aufhebung der Hellrothemmwirkung durch Dunkelrot 2 Faktoren berücksichtigen muß: 1. Die Stärke der Hemmung durch Hellrot, 2. das Zeitintervall zwischen der Hellrot- und Dunkelrotbestrahlung. Die Beseitigung der Hellrothemmung war deutlich erschwert, wenn die Hellrotenergie größer war, als eigentlich bis zur völligen Hemmung — also bis zur Erreichung des Grenzwertes Hellrot — erforderlich war. Wurden Versuchspflanzen zu einer bestimmten Zeit während der Dunkelperiode mit einer wesentlich höheren Energie gestört, so war eine Aufhebung der Hemmwirkung z. T. sogar unmöglich. Deshalb mußte bei allen Versuchen, bei denen die Dunkelrotenergie bestimmt werden sollte, die die Hellrothemmung beseitigt, genau darauf geachtet werden, daß die Pflanzen nur soweit gehemmt wurden, wie es der Grenzwert Hellrot angibt. Nur in diesem Falle können quantitative Angaben über die Größe der Dunkelrotenergie, die zur Beseitigung der Hemmwirkung genügt, gemacht werden.

Um diesen Grenzwert Hellrot zu erreichen, war es zu Beginn und am Ende der Dunkelphase nötig, längere Störzeiten mit Hellrot zu geben. Es mußte also festgestellt werden, welcher Zeitabstand zwischen der

Hellrot- und Dunkelroteinstrahlung liegen darf, bis ein merklicher Abfall der Aufhebungswirkung durch das Dunkelrot auftritt. Dazu wurde folgendes Experiment angesetzt. Mehrere Versuchsgruppen, jeweils aus 5 Pflanzen bestehend, wurden bis zum Grenzwert Hellrot gestört und sofort danach oder im Zeitabstand von je 10 min 5 sec lang mit Dunkelrot bestrahlt. Der Versuch umfaßte 10 Cyclen einer 10stündigen Hauptlichtperiode und einer 14stündigen Dunkelperiode. Die Auswertung erfolgte 10 und 15 Tage nach Versuchsbeginn. Die Ergebnisse, als Mittelwerte von je 5 Pflanzen, zeigt Abb. 12.

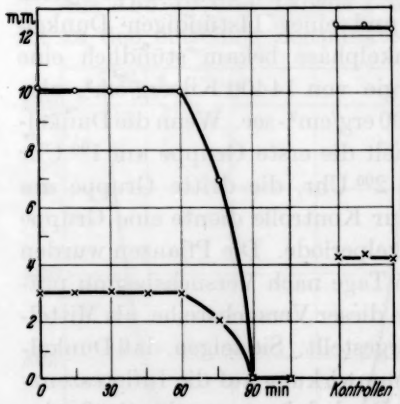


Abb. 12. Zeitintervall zwischen Hellrothemmung der Infloreszenz und der Aufhebung der Hemmung durch Dunkelrotlicht während einer 14stündigen Dunkelperiode bei 10 Cyclen. *Ordinate:* Infloreszenzgröße in Millimeter; *Abszisse:* Zeit zwischen Hellrot- und Dunkelrotlichteinstrahlung in Minuten. Auswertung: 10 Tage ×——× und 15 Tage o——o nach Versuchsbeginn. Kontrollen: ohne Störlicht in der Dunkelperiode

Dieser Versuch ließ erkennen, daß eine sichtbare Abnahme der Infloreszenzgröße erst nach einem Zeitintervall von 60 min erfolgte. DOWNS 1956 erhielt bei anderen Kurztagpflanzen ähnliche Ergebnisse. Somit wird auch bei längerer Störlichtdauer mit Hellrot während der Dunkelperiode die Fehlerquelle ausgeschaltet, die durch Überschreitung dieses Intervalles entstehen könnte. Nur beim ersten und letzten Meßwert während der Dunkelperiode kann dadurch eine leichte Erhöhung der zur völligen Hemmung notwendigen Störlichtenergie eintreten.

Um zu bestimmen, welche Dunkelrotenergie zur Aufhebung der Grenzenergie Hellrot nötig ist, wurden jetzt mehrere Einzelversuche angesetzt. Dazu wurden mehrere Gruppen von Pflanzen zu den verschiedenen Zeitpunkten der Dunkelphase mit der entsprechenden Grenzenergie Hellrot gestört und sofort danach den einzelnen Gruppen verschieden hohe Dunkelrotenergie geboten, dies in 10 Cyclen bei einer 10stündigen Hauptlichtperiode und einer 14stündigen Dunkelperiode. Die Auswertung erfolgte 10 und 15 Tage nach Versuchsbeginn. Abb. 13 gibt eine graphische Darstellung dieser Meßwerte, die den Mittelwert von je 5 Pflanzen darstellen. Tabelle 1 gibt die Zeitdauer und Energiegröße des Grenzwertes Hellrot zu den einzelnen Zeitpunkten, die Dauer und Energie des Störlichtes Dunkelrot sowie die Mittelwerte der Infloreszenzgrößen nach der Aufhebung der Hemmung an. Infloreszenzgröße Null gibt den vegetativen Zustand an.

Das Ergebnis dieser Versuchsreihe war überraschend; wurden die Pflanzen mit der Grenzenergie Hellrot gestört, die während der Dunkel-

Tabelle 1. *Angabe der Grenzenergie Hellrot zu einzelnen Zeitpunkten der Dunkelperiode und der Dunkelrotenergie, die zur Aufhebung der Infloreszenzhemmung führt; sowie der Störlichtzeit und -dauer. Energie in Kiloerg/cm², Infloreszenzgrößen als Mittelwerte in Millimetern, 10 und 15 Tage nach Versuchsbeginn ausgewertet*

Zeitpunkt	Grenzenergie des Störlichts Hellrot			Aufhebung durch Dunkelrotlicht			Infloreszenzgröße in mm	
	Energie Kiloerg/cm²	Zeit	Dauer	Energie Kiloerg/cm²	Zeit	Dauer sec	Tage nach VB 10	15
3^{00}	86400	2^{15}—3^{45}	90 min	16	3^{45}	1	0	0
				32		2	0	0
				48		3	3,3	10,7
				64		4	3,2	10,5
				80		5	3,1	10,4
4^{00}	14400	3^{53}—4^{08}	15 min	16	4^{08}	1	0	0
				32		2	0	0
				48		3	3,1	10,3
				64		4	3,0	10,1
				80		5	2,9	9,8
4^{20}	4800	4^{18}—4^{23}	5 min	16	4^{23}	1	0	0
				32		2	0	0
				48		3	2,8	9,8
				64		4	2,8	9,6
				80		5	2,7	9,4
6^{00}	640	6^{00}	40 sec	16	6^{01}	1	0	0
				32		2	0	0
				48		3	2,5	9,3
				64		4	2,4	9,0
				80		5	2,4	8,7
6^{40}	240	6^{40}	15 sec	16	6^{41}	1	0	0
				32		2	0	0
				48		3	2,3	8,7
				64		4	2,3	8,4
				80		5	2,2	8,1
7^{20}	640	7^{20}	40 sec	16	7^{21}	1	0	0
				32		2	0	0
				48		3	2,1	8,2
				64		4	2,0	8,0
				80		5	2,0	7,8
9^{00}	4800	8^{57}—9^{02}	5 min	16	9^{02}	1	0	0
				32		2	0	0
				48		3	1,9	7,8
				64		4	1,8	7,5
				80		5	1,8	7,2
10^{00}	52800	9^{32}—10^{27}	55 min	16	10^{27}	1	0	0
				32		2	0	0
				48		3	1,6	7,0
				64		4	1,5	6,9
				80		5	1,4	6,7
				Kontrolle ohne Störlicht			4,1	12,6

phase stark variierte, so *genügte doch zu jedem Zeitpunkt die gleiche Dunkelrotenergie, um diese Störung zu beseitigen.* Bei 32 Kiloerg/cm²,

also einer Störduer von 2 sec, fand noch keine Aufhebung der Hemmung statt; wohl aber bei 3 sec, also einer Dunkelrotenergie von 48 Kiloerg/cm². Eine Erhöhung dieser Energie auf 64 Kiloerg/cm² bedeutete nun aber keine weitere Steigerung der Infloreszenzgröße, sondern im Gegenteil eine Abnahme. Bei einer zu jeder Zeit konstanten Energie erreichte die Aufhebung der Hemmung ein Maximum, das aber immer unter der Infloreszenzgröße jener Kontrollpflanzen blieb, die während der gesamten 14stündigen Dunkelperiode kein Störlicht erhielten. Weiterhin fällt hierbei auf, daß die Infloreszenzgröße vom Beginn bis zum Ende der Dunkelperiode stetig abnahm, wie Abb. 14 für den Maximalwert zeigt.

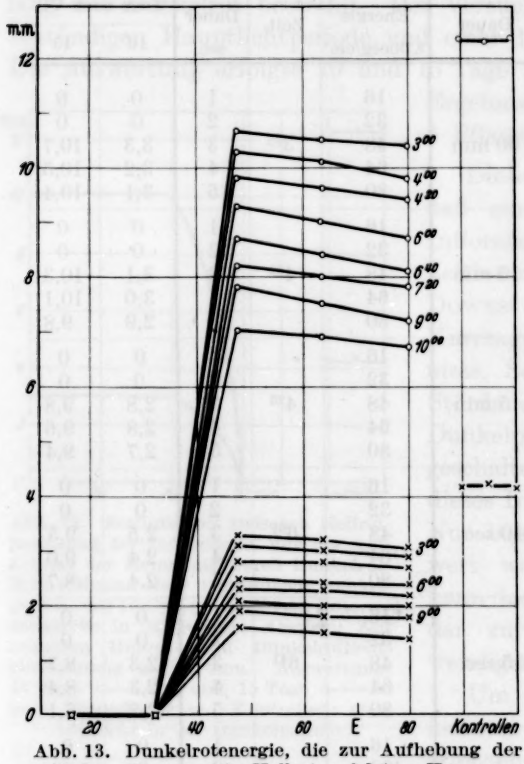


Abb. 13. Dunkelrotenergie, die zur Aufhebung der mit der Grenzenergie Hellrot erfolgten Hemmung während der 14stündigen Dunkelphase erforderlich ist. *Ordinate:* Infloreszenzgrößen zu den verschiedenen Zeitpunkten in Millimetern; *Abszisse:* Dunkelrotenergie in Kiloerg/cm². Auswertung: 10 Tage ×——× und 15 Tage o——o nach Versuchsbeginn. Kontrollen: ohne Störlicht während der Dunkelperiode

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß *während der Dunkelperiode hellrotes Störlicht zu jeder Zeit eine Hemmwirkung auf die Infloreszenzbildung ausübt; daß zur Hemmung bis zu einem bestimmten Stadium zu verschiedenen Zeiten stark variierende Störlichtenergien erforderlich sind, während zur Aufhebung dieser bis zu einem Grenzwert durchgeführten Hemmung eine konstante Dunkelrotenergie nötig ist.* Dunkelrotes Störlicht allein zeigt während der Dunkelphase keine Hemmwirkung. Die Pflanzen, die mit Dunkelrot während der Dunkelperiode gestört werden, zeigen die gleiche Infloreszenzgröße wie die Kontrollpflanzen, die eine ungestörte Dunkelphase erhalten; dagegen erfolgt die Aufhebung des Störlichts Hellrot durch Dunkelrot niemals bis zu jener Infloreszenzgröße, wie sie die ungestörten Kontrollen aufweisen.

2. Störlicht während der Lichtperiode

Nachdem nun durch Störlichtversuche die Dunkelphase abgetastet und das unterschiedliche Verhalten gegen Hell- und Dunkelrot erkannt

worden war, trat natürlicherweise die Frage auf, ob diese Wellenlängenbereiche auch während der Hauptlichtperiode eine Infloreszenzhemmung hervorrufen und ob vielleicht auch hier eine antagonistische Wirkung beobachtet werden kann.

Will man während der Lichtperiode mit Farblicht Versuche ansetzen, so ergeben sich einige Probleme. Die weiße Hauptlichtperiode kann nur durch Einschaltung von mehr oder weniger langer Farblichtdauer unterbrochen werden, derart, daß statt des Weißlichts Farblicht gegeben wird. Will man die Wirkung von Hellrot und Dunkelrot untersuchen, so erhebt sich die Forderung, daß das Licht, welches in der Hauptlichtperiode geboten wird, von diesen Lichtqualitäten frei sein sollte. Somit käme nur der Blau-Gelb-Grün-Bereich in Betracht. Nun ist Grünlicht für photosynthetische Prozesse, die ja während der Lichtperiode ablaufen müssen, nicht verwertbar. Ferner ist zu erwarten, daß auch Blaulicht, wie in der Dunkelperiode (Parker et al. 1946), so auch hier eine Wirkung hervorruft. Aus diesen Gründen wurden die Versuche mit einer weißen Hauptlichtperiode durchgeführt, die also einen Hellrotanteil, aber nur einen geringen Dunkelrotanteil besitzt. Dies muß bei der Wertung der Versuchsergebnisse stets berücksichtigt werden.

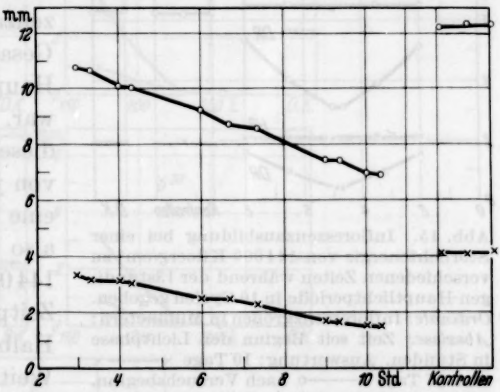


Abb. 14. Abnahme der Infloreszenzgröße bei der Aufhebung durch Dunkelrotlicht mit der Zeit während der 14stündigen Dunkelperiode. *Ordinate:* Infloreszenzgröße in Millimetern; *Abszisse:* Zeit während der Dunkelperiode in Stunden. Auswertung: 10 Tage ×———× und 15 Tage o———o nach Versuchsbeginn. Kontrollen: ohne Störlicht in der Dunkelperiode

Um eine Blühförderung oder -hemmung den Kontrollen gegenüber besser erkennen zu können, wurde mit überoptimalen Bedingungen gearbeitet, also stets mit einer 13stündigen Hauptlichtperiode und einer 11stündigen Dunkelperiode, jeweils in 10 Cyclen. Es erfolgten auch Gegenkontrollen mit einer 4stündigen Hauptlichtperiode, also unteroptimal, die prinzipiell zu gleichen Ergebnissen führten. Eine Veränderung der Lichtqualität der Hauptlichtperiode durch teilweisen Ersatz des Weißlichtes mit Farblicht kann aber auch zu einer Veränderung der Photosyntheseleistung und dadurch zu einer Änderung der Infloreszenzgröße führen. Deshalb sind bei jedem Versuch neben den Kontrollen mit einer ungestörten Hauptlichtperiode auch solche Kontrollen anzusetzen, die während der gleichen Zeitdauer, zu der Farblicht geboten wurde, Dunkelheit erhielten.

a) Störlicht „Hellrot". Die gleichen methodischen Einrichtungen, die für die Störlichtversuche während der Dunkelperiode benutzt wurden, dienten auch für die Störung der Lichtperiode. Der Hellrotbereich betrug hier ebenfalls 610—690 mμ mit einer Intensität von 16000 erg/cm^2 · sec. Die ersten Experimente wurden mit konstanter Störlichtenergie

Hellrot in 10 Cyclen durchgeführt. Dauerte die Hauptlichtperiode von 0—13 Uhr, so erhielten die einzelnen Gruppen jeweils um 2^{00}, 3^{30}, 5^{00}, 6^{30} und 8^{00} Uhr Störlicht konstanter Intensität. Die Störlichtdauer betrug dabei 0,5, 1, 2, 2,5 und 3 Std. Bei allen Serien, die jeweils 10 und 15 Tage nach Versuchsbeginn ausgewertet wurden, zeigte sich kein Unterschied der Infloreszenzgröße zwischen jenen Pflanzen, die Störlicht Hellrot erhielten und denen, die eine ungestörte weiße Hauptlichtperiode hatten. Auch die Kontrollen, die während der jeweiligen Störlichtdauer dunkel standen, zeigten fast die gleiche Größe der Infloreszenzausbildung, obwohl doch die Gesamtlichtmenge während der Hauptlichtperiode verkürzt worden war. Abb. 15 zeigt die Ergebnisse dieser Versuchsserie in Mittelwerten von je 5 Pflanzen, dargestellt für eine Störlichtdauer von 2,5 Std, also einer Hellrotenergie von 144000 Kiloerg/cm². Die einzelnen Zeitpunkte geben auch hier die Halbzeit der Störlichtdauer an. Weiterhin sind die Meßwerte der ungestörten Weißlicht- und der Dunkelkontrollen aufgetragen. Die sehr geringe Erhöhung der Infloreszenzgröße bei den Dunkelkontrollen den ersteren gegenüber ist dabei auf eine Verkürzung der Hauptlichtperiode zurückzuführen. Somit kann gesagt werden, daß *Hellrot während der Hauptlichtperiode* — wie Dunkelrot während der Dunkelperiode — *keine erkennbare Hemmwirkung* auf die Infloreszenzbildung ausübt.

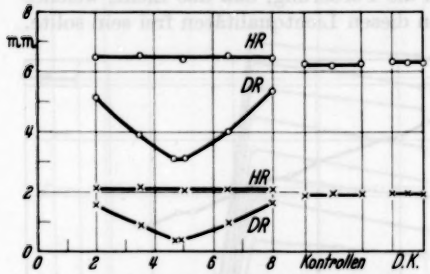


Abb. 15. Infloreszenzausbildung bei einer Störlichtenergie von 144000 Kiloerg/cm² zu verschiedenen Zeiten während der 13stündigen Hauptlichtperiode in 10 Cyclen gegeben. *Ordinate:* Infloreszenzgrößen in Millimetern; *Abszisse:* Zeit seit Beginn der Lichtphase in Stunden. Auswertung: 10 Tage ×——× und 15 Tage o——o nach Versuchsbeginn. HR = hellrotes, DR = dunkelrotes Störlicht. Kontrollen: ohne Störlicht in der Hauptlichtperiode. DK = Dunkelkontrollen, die statt Störlicht Dunkelheit während der gleichen Zeit erhielten

b) Störlicht „Dunkelrot". Auch diese Experimente wurden analog zu den Versuchen während der Dunkelperiode durchgeführt. Der Dunkelrotbereich lag zwischen 705 und 980 mμ und die Intensität betrug ebenfalls 16000 erg/cm² · sec. Störlicht Dunkelrot dieser Intensität von kürzerer Dauer, 15, 30 und 60 min lang zu verschiedenen Zeiten der Hauptlichtperiode gegeben, zeigte zunächst keinen Hemmeffekt, der statistisch zu sichern gewesen wäre. Erst bei Störlichtzeiten von 2,5 Std und darüber konnte ein eindeutiges Ergebnis erzielt werden. Dies zeigt Abb. 15. Die Störlichtenergie betrug in dieser Versuchsserie 144000 Kiloerg/cm², das bedeutet bei der benutzten Intensität eine Störlichtdauer von 150 min. Bei einer Hauptlichtperiode von 0—13 Uhr wurde um 2^{00}, 3^{30}, 5^{00}, 6^{30} und 8^{00} Uhr in 10 Cyclen gestört und die Infloreszenzgröße 10 Tage, also am Versuchsende, und 15 Tage nach Versuchsbeginn

ausgemessen. Die angegebenen Zeitpunkte bezeichnen die Halbzeiten der benutzten Störlichtdauer. Gegenüber den ungestörten Weißlicht- und Dunkelkontrollen, die auch hier wieder fast gleiche Werte ergaben, zeigten die Pflanzen, die dunkelrotes Licht obiger Energie erhielten, eine deutliche Hemmung in der Infloreszenzausbildung, die gegen 5^{00} Uhr ein Maximum aufwies.

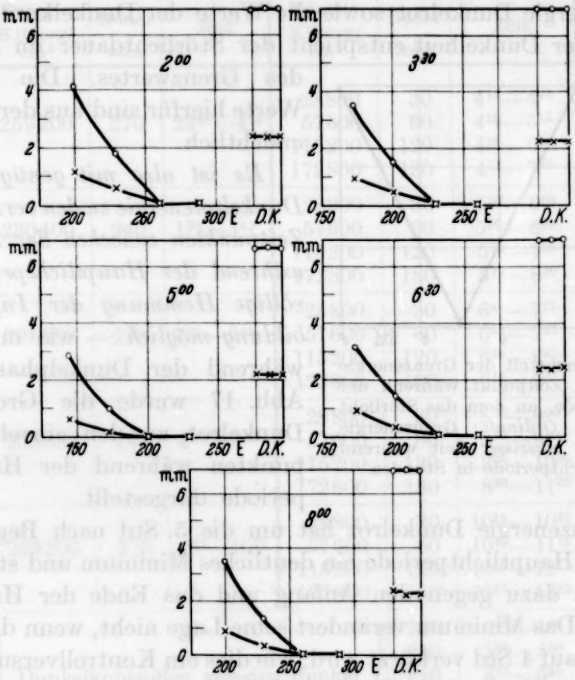


Abb. 16. Infloreszenzausbildung zu verschiedenen Zeitpunkten während der 13stündigen Hauptlichtperiode bei variierender Störlichtenergie Dunkelrot. *Ordinate:* Infloreszenzgröße in Millimetern; *Abszisse:* Störlichtenergie Dunkelrot in 1×10^3 Kiloerg/cm². Auswertung erfolgte 10 Tage ×——× und 15 Tage o——o nach Versuchsbeginn. DK = Dunkelkontrollen, die statt Störlicht Dunkelheit erhielten. Um 5^{00} Uhr 210 min, um 2^{00}, 3^{30} und 6^{30} Uhr 240 min und um 8^{00} Uhr 270 min Dunkelheit

Mit einer weiteren Versuchsanordnung sollte festgestellt werden, ob bei entsprechend höherer Energie von Dunkelrot, also noch längeren Störlichtzeiten, eine völlige Hemmung der Infloreszenzausbildung zu erreichen wäre. Deshalb wurde nun in mehreren Serien zu den gleichen Zeitpunkten wie beim obigen Versuch den einzelnen Pflanzengruppen verschieden hohe Störlichtenergie Dunkelrot geboten. Eine Erhöhung der Energie führte auch hier zu allen Zeitpunkten zu einer Herabsetzung der Infloreszenzgröße bis zu jenem Punkt, an dem die Pflanzen gerade vegetativ blieben. Die Infloreszenzgröße ist dort Null. Dieses Stadium erhielt die Bezeichnung: „Grenzwert des Störlichts Dunkelrot". Diese Grenzenergie und die Störlichtdauer zu den einzelnen Zeitpunkten während

der Hauptlichtperiode gibt Tabelle 2 an. Da die Störlichtintensität stets konstant war, ist nicht nur die Störlichtenergie, sondern auch die Störlichtdauer vergleichbar. Dieses Experiment wurde in 10 Cyclen durchgeführt, die Auswertung erfolgte 10 und 15 Tage nach Versuchsbeginn. Die Ergebnisse dieser Serie wurden dann in Abb. 16 eingezeichnet. Diese 5 Einzeldarstellungen geben zu den jeweiligen Störlichtzeiten die Grenzenergie Dunkelrot sowie die Werte der Dunkelkontrollen an. Die Dauer der Dunkelheit entspricht der Störlichtdauer im Zeitpunkt des Grenzwertes. Die einzelnen Werte hierfür sind aus der Tabelle 2 ersichtlich.

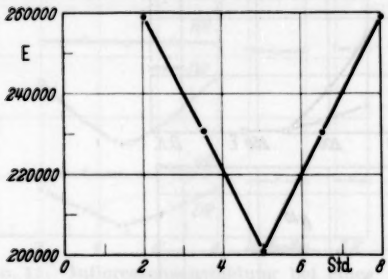


Abb. 17. Abhängigkeit der Grenzenergie Dunkelrot vom Zeitpunkt während der Hauptlichtperiode, an dem das Störlicht gegeben wurde. *Ordinate:* Grenzenergie in Kiloerg/cm²; *Abszisse:* Zeit während der Hauptlichtperiode in Stunden

Es ist also mit genügend hoher Dunkelrotenergie zu den verschiedenen Zeitpunkten zwischen der 2.—8. Std während der Hauptlichtperiode eine völlige Hemmung der Infloreszenzbildung möglich — wie mit Hellrot während der Dunkelphase. — In Abb. 17 wurde die Grenzenergie Dunkelrot zu den einzelnen Zeitpunkten während der Hauptlichtperiode dargestellt.

Die Grenzenergie Dunkelrot hat um die 5. Std nach Beginn einer 13stündigen Hauptlichtperiode ein deutliches Minimum und steigt dann symmetrisch dazu gegen den Anfang und das Ende der Hauptlichtperiode an. Das Minimum verändert seine Lage nicht, wenn die Hauptlichtperiode auf 4 Std verkürzt wird, wie dies ein Kontrollversuch zeigte. Es liegt also nicht in der Mitte der Hauptlichtperiode, sondern in der Mitte der photophilen Phase.

c) Aufhebung der Blühhemmung durch „Hellrot". Da es während der Dunkelphase möglich war, den Hellrothemmeffekt durch Dunkelrot wieder aufzuheben, während der Hauptlichtperiode aber dunkelrotes Licht hemmend wirkte, so sollte versucht werden, ob die Dunkelrothemmung durch Hellrot aufzuheben ist. Dazu wurden zu den gewählten Zeiten, 2^{00}, 3^{30}, 5^{00}, 6^{30} und 8^{00} Uhr, die Pflanzen mit der Grenzenergie Dunkelrot gestört und anschließend mit Hellrot einer Intensität von 16000 erg/cm² · sec verschieden lang bestrahlt. Dabei ergaben Hellrotzeiten von 15, 30 und 60 min Dauer keine aufhebende Wirkung. Diese zeigte sich erst bei einer Hellrotdauer von 2—3 Std. Die Ergebnisse dieser Versuchsserie wurden in Tabelle 2 zusammengefaßt. Sie stellt die zu den einzelnen Zeitpunkten benutzte Grenzenergie Dunkelrot, die Dauer der Störlichteinwirkung und die verschiedenen Hellrotenergien sowie deren Dauer, mit denen die Aufhebung versucht wurde, dar.

Tabelle 2. *Angabe der Grenzenergie Dunkelrot zu einzelnen Zeitpunkten während der Hauptlichtperiode und der Hellrotenergie, die zur Aufhebung der Infloreszenzhemmung führt; sowie Angabe der Störlichtdauer und Störlichtzeit. Energie in Kiloerg/cm², Infloreszenzgrößen sind Mittelwerte in Millimetern, 10 und 15 Tage nach Versuchsbeginn ausgewertet*

Zeitpunkt	Grenzenergie des Störlichts Dunkelrot			Aufhebung durch Störlicht Hellrot			Infloreszenzgröße in mm	
	Energie Kiloerg/cm²	Dauer min	Zeit	Energie Kiloerg/cm²	Dauer min	Zeit	Tage nach VB	
							10	15
2^{00}	259200	270	23^{45}—4^{15}	28800	30	4^{15}—4^{45}	0	0
				57600	60	4^{15}—5^{15}	0	0
				115200	120	4^{15}—6^{15}	1,2	5,1
				172800	180	4^{15}—7^{15}	1,9	6,3
3^{30}	230400	240	1^{30}—5^{30}	28800	30	5^{30}—6^{00}	0	0
				57600	60	5^{30}—6^{30}	0	0
				115200	120	5^{30}—7^{30}	1,2	5,1
				172800	180	5^{30}—8^{30}	1,8	6,2
5^{00}	201600	210	3^{15}—6^{45}	28800	30	6^{45}—7^{15}	0	0
				57600	60	6^{45}—7^{45}	0	0
				115200	120	6^{45}—8^{45}	1,1	5,0
				172800	180	6^{45}—9^{45}	1,7	6,2
6^{30}	230400	240	4^{30}—8^{30}	28800	30	8^{30}—9^{00}	0	0
				57600	60	8^{30}—9^{30}	0	0
				115200	120	8^{30}—10^{30}	1,1	4,9
				172800	180	8^{30}—11^{30}	1,6	5,9
8^{00}	259200	270	5^{45}—10^{15}	28800	30	10^{15}—10^{45}	0	0
				57600	60	10^{15}—11^{15}	0	0
				115200	120	10^{15}—12^{15}	1,0	4,9
				172800	180	10^{15}—13^{15}	1,6	5,9
2^{00}	Dunkelkontrollen standen dunkel				240	0^{00}—4^{00}	2,3	6,8
3^{30}					240	1^{30}—5^{30}	2,3	6,8
5^{00}					210	3^{15}—6^{45}	2,2	6,7
6^{30}					240	4^{30}—8^{30}	2,3	6,8
8^{00}					270	5^{45}—10^{15}	2,4	6,9
				Kontrolle ohne Störlicht			2,1	6,3

Abb. 18 gibt die Darstellung dieser Meßwerte an. Es sind die Mittelwerte von je 5 Pflanzen. Die Auswertung der Versuche erfolgte auch hier 10 und 15 Tage nach Versuchsbeginn. Es erwies sich, daß die Grenzenergie Dunkelrot jeweils durch die gleiche Hellrotenergie wieder aufgehoben wurde und daß es auch hier einen Schwellenwert der Hellrotenergie gab, unterhalb dessen keine Aufhebung erfolgte. Verglichen mit der Dunkelphase war die Schwellenwertenergie hier aber wesentlich höher, außerdem ließ sich bei diesen Ergebnissen auch kein Maximum der Aufhebung feststellen; denn die Infloreszenz war um so größer, je höhere Hellrotenergie zur Aufhebung benutzt wurde. Sie erreichte fast jene Größe, die die Kontrollpflanzen ohne Störlicht in der Hauptlichtperiode aufwiesen. Dagegen stimmte mit der Dunkelperiode überein,

daß die Größe der Infloreszenz zum Ende der Hauptlichtperiode abnahm, wenn auch wesentlich geringer. Das soll Abb. 19 zeigen. In Abb. 18 wurde die Größe der Aufhebung für die Zeitpunkte 2^{00} und 8^{00} Uhr eingezeichnet, die Werte für die anderen Zeitpunkte liegen zwischen diesen, wie es aus Abb. 19 ersichtlich ist.

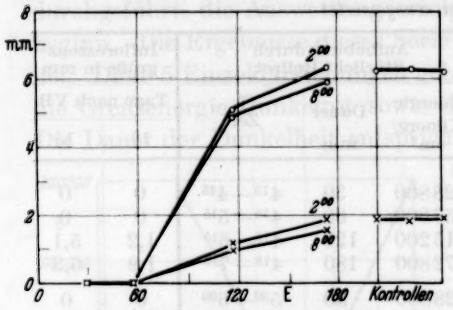


Abb. 18. Hellrotenergie, die zur Aufhebung der mit der Grenzenergie Dunkelrot erfolgten Hemmung während der 13stündigen Hauptlichtperiode erforderlich ist. *Ordinate:* Infloreszenzgrößen zu den verschiedenen Zeiten in Millimetern; *Abszisse:* Hellrotenergie in 1×10^3 Kiloerg/cm². Auswertung: 10 Tage ×——× und 15 Tage o——o nach Versuchsbeginn. Kontrollen: ohne Störlicht während der Hauptlichtperiode

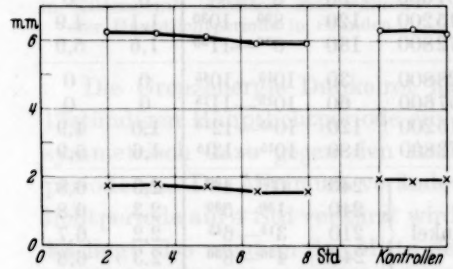


Abb. 19. Abnahme der Infloreszenzgröße bei der Aufhebung durch Hellrotlicht mit der Zeit während der 13stündigen Hauptlichtperiode. *Ordinate:* Infloreszenzgröße in Millimetern; *Abszisse:* Zeit seit Beginn der Hauptlichtperiode in Stunden. Auswertung: 10 Tage ×——× und 15 Tage o——o nach Versuchsbeginn. Kontrollen: ohne Störlicht in der Hauptlichtperiode

Diese Versuche ergeben, *daß in der Hauptlichtperiode hellrotes Störlicht keine Hemmung auf die Infloreszenzanlage ausübt, während Dunkelrot zu jeder Zeit der Lichtperiode hemmend wirkt, aber in verschiedener Stärke. Diese Hemmung kann, wenn sie bis zum Grenzwert Dunkelrot erfolgte, durch eine konstante Hellrotenergie wieder aufgehoben werden.* Somit verläuft im allgemeinen der Hellrot-Dunkelrotantagonismus, was Hemmung der Infloreszenz und deren Aufhebung anbetrifft, während der Hauptlichtperiode gerade umgekehrt als in der Dunkelperiode. Dagegen ist die Grenzenergie in der Hauptlichtperiode etwa um das Zehnfache größer als während der Dunkelperiode. Dies mag wenigstens teilweise seinen Grund in den ungünstigeren Bedingungen und damit verbundenen größeren Fehlerquellen haben; hierauf soll in der Diskussion noch näher eingegangen werden.

3. Deutung dieser Ergebnisse durch die endogene Rhythmik

Bei den bisherigen Ergebnissen wurde stets von Störlichtversuchen während der Dunkel- und der Hauptlichtperiode gesprochen, ohne dabei die zeitliche Lage der photo- und skotophilen Phase zu beachten, die ja durch die Registrierung der Blattbewegung unter den gleichen äußeren Bedingungen erkannt wurde. Man hätte ja die Störlichtexperimente symmetrisch zu den Hebungs- und Senkungsmaxima der Blattbewegung anordnen können. Diese wurden absichtlich nicht vorweggenommen;

vielmehr sollte durch die Störlichtversuche die zeitliche Lage der Phasen bestimmt und dann mit den Ergebnissen, die durch die Blattbewegung gewonnen worden waren, verglichen werden.

Zu diesem Zwecke wurde nochmals eine Versuchsserie angesetzt, bei der die Dauer von Dunkel- und Lichtperiode jener entsprach, bei der die Blattbewegungen registriert worden waren. Die Pflanzen erhielten also eine 10stündige Hauptlichtperiode und eine 14stündige Dunkelphase. Während dieser 24 Std wurden zu verschiedenen Zeiten

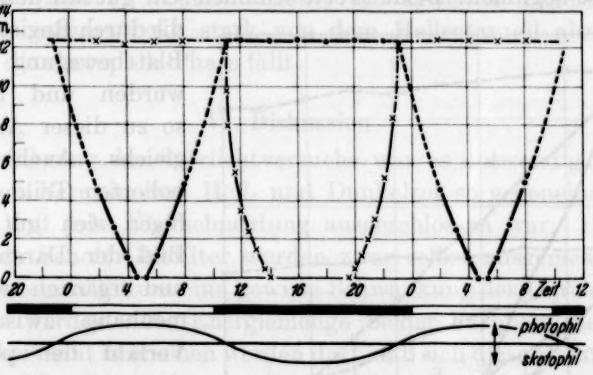


Abb. 20. Infloreszenzausbildung bei Störlichtversuchen mit Hellrot- und Dunkelrotlicht während der 10stündigen Licht- und der 14stündigen anschließenden Dunkelperiode in 10 Cyclen. Der ausgezogene Teil der Kurve wurde durch Meßwerte erhalten, der gestrichelte Teil ist danach extrapoliert. Störlichtenergie während der Hauptlichtperiode 200000 Kiloerg/cm², während der Dunkelperiode 20000 Kiloerg/cm². *Ordinate:* Infloreszenzgröße in Millimetern; *Abszisse:* Zeit in Stunden. (Schwarze Felder = Dunkelheit, weiße Felder = Lichtperiode; darunter der Verlauf der photophilen und skotophilen Phase. Hellrot: ×——×, Dunkelrot: ●——●.) Auswertung nach 15 Tagen. Infloreszenzgröße der Kontrollpflanzen ohne Störlicht 12,4 cm

je eine Gruppe von 5 Pflanzen mit Hellrot oder Dunkelrot gestört. Die Kurztaginduktion betrug 10 Cyclen; die Auswertung erfolgte teils sofort danach, teils 5 Tage später, also 10 und 15 Tage nach Versuchsbeginn. Die Störlichtenergie für Hellrot und Dunkelrot betrug in der Hauptlichtperiode 200000 Kiloerg/cm², das sind 210 min Störlichtdauer bei einer Intensität von 16000 erg/cm² · sec, und während der Dunkelperiode 20000 Kiloerg/cm², das entspricht 21 min, also $^1/_{10}$ der Störlichtdauer während der Lichtperiode. Die Meßwerte der Auswertung 15 Tage nach Versuchsbeginn wurden in Abb. 20 eingetragen. Während der Hauptlichtperiode von 0—10 Uhr wurde zwischen 2^{00} und 8^{00} Uhr mit Hellrot- alle 90 min, mit Dunkelrotlicht alle 60 min gestört; während der Dunkelphase von 10—24 Uhr wurde zwischen 11^{00} und 22^{00} Uhr mit Hellrot- alle 30 min, mit Dunkelrotlicht alle 60 min gestört. Diese Bereiche wurden durch den ausgezogenen Teil der Kurve angedeutet, der gestrichelte Teil gibt extrapolierte Werte an. Darunter wurde die Lage der Licht- und Dunkelphase abgetragen.

Wenn man jetzt das Maximum der Hemmung durch Dunkelrot während der Lichtphase und das Maximum der Hemmung durch Hellrot in der Dunkelphase — beide Maxima liegen ziemlich genau 12 Std auseinander — als Maxima der photo- und skotophilen Phase annimmt und danach den Verlauf derselben einzeichnet, wie dies in Abb. 20 geschah, so erkennt man, daß die skotophile Phase etwa 11 Std nach Lichtbeginn einsetzt. Rechnet man für beide Phasen eine Dauer von etwa 12 Std, so würde die photophile Phase etwa 1 Std vor Anfang der Lichtphase beginnen. Beide Werte stimmen sehr gut mit denen überein, die durch Registrierung der Blattbewegung gewonnen wurden und berechtigen so zu dieser Art des Vergleichs. Auch die extrapolierten Teile der Kurve fügen sich gut in dieses Bild der Darstellung ein, und ergänzen den Zusammenhang zwischen dem Verlauf der photo- und skotophilen Phase und der verschieden starken Sensibilität der Pflanzen gegenüber Hellrot- und Dunkelrotlicht.

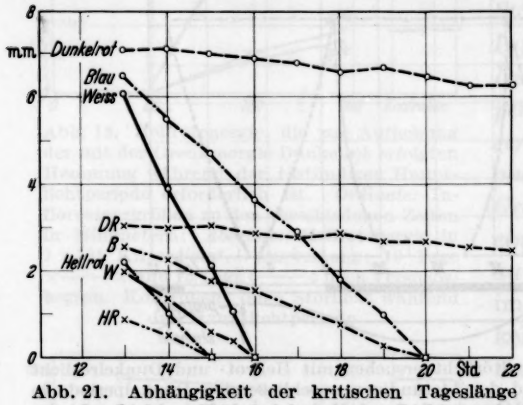


Abb. 21. Abhängigkeit der kritischen Tageslänge von der Lichtqualität bei konstanter Lichtenergie. *Ordinate:* Infloreszenzgrößen in Millimetern; *Abszisse:* Kritische Tageslänge in Stunden. Von 0—12 Uhr wurde Weißlicht gegeben. Auswertung: 10 Tage ×——× und 15 Tage o——o nach Versuchsbeginn

4. Kritische Tageslänge bei Farblicht

Die Hellrothemmwirkung in der Dunkelphase legte den Gedanken nahe, daß auch die kritische Tageslänge, bei Kurztagpflanzen also die obere kritische Grenze, im Licht verschiedener Farbqualität unterschiedlich lang sein müsse.

Bei den folgenden Experimenten erhielten die Pflanzen eine 12 Std lange weiße Lichtperiode, damit ausreichend Assimilate gebildet werden konnten, und anschließend Farblicht einer Intensität von 16000 erg/cm² · sec von verschiedener Dauer; insgesamt erhielten die einzelnen Gruppen in 10 Zyklen eine tägliche Belichtung von 15, 16, 17, 18, 19 und 20 Std. Abb. 21 zeigt die Ergebnisse dieser Serie 10 und 15 Tage nach Versuchsbeginn ausgewertet.

Dieser Versuch zeigt, *daß die kritische Tageslänge in verschiedenfarbigem Licht unterschiedlich ist.* Sie ist in reinem Hellrot kürzer als bei Weißlicht, dagegen in nahezu hellrotfreiem Blaulicht länger als im Weißlicht. Im hellrotfreien Dunkelrot ist die Abnahme der Infloreszenzgröße mit der Tageslänge so gering, daß man annehmen könnte, die

Pflanzen würden auch bei Dauerlicht noch blühen, wenn nur während der skotophilen Phase kein hellrotes Licht mehr gegeben wird.

Unter gleichen Bedingungen wurde noch ein weiteres Experiment angesetzt, bei dem die Weißlichtperiode von 12 auf 3 Std verkürzt wurde. Alle Pflanzen erhielten 3 Std Weißlicht, danach 9 Std Dunkelheit und daran anschließend Farblicht verschiedener Länge zwischen 3 und 8 Std. Die Ergebnisse dieses Versuches stimmen mit denen des vorangegangenen völlig überein, obwohl die weiße Lichtperiode hier unteroptimal war (Abb. 3). Somit scheint die kritische Tageslänge bei *Chenopodium amaranticolor* stark von dem Hellrotanteil abzuhängen, der noch in die skotophile Phase fällt.

VI. Diskussion

Zur Ausführung der Störlichtversuche war es notwendig, die nahe benachbarten Bereiche von Hell- und Dunkelrot so gegeneinander abzugrenzen, daß jede Überschneidung ausgeschlossen war. Die hierzu ausgewählten Schott-Glasfilter wurden zwar selbst ausgemessen, doch muß den einzelnen Filtern eine gewisse Schwankung der Durchlässigkeit zugestanden werden. Die Energiemenge beider Farbbereiche war die gleiche, wobei nicht übersehen werden darf, daß sich diese Gesamtenergie auf einen engen Wellenlängenbereich im Hellrot und einem wesentlich weiteren im Dunkelrot erstreckt. Wenn trotzdem mit gleicher Energie gearbeitet wurde, dann deshalb, weil man annimmt, daß Strahlung oberhalb von 800 mμ von der Pflanze nicht mehr verwertet, und so doch etwa gleiche Energie absorbiert wird. Wieviel dieser Energie dann aber tatsächlich für die untersuchten Prozesse zur Verfügung stand, bleibt dabei völlig offen.

Störlichtversuche sind oft beschrieben worden (vgl. die Zusammenfassungen bei Murneek 1948; Parker and Borthwick 1950; Hendricks and Borthwick 1954; Stolwijk 1954b). Bei diesen Versuchen war die Störlichtintensität stets ein kritischer Faktor, denn eine Energieerhöhung bedeutete meist eine Verlängerung der Störlichtdauer, doch dies läßt sich nur innerhalb bestimmter Grenzen verantworten. Es fehlt zur Zeit noch an Lichtquellen hoher Energie, die nur enge Wellenbereiche aussenden. Jede Arbeit mit Filtern, gar mit Interferenzfiltern, bedeutet Verlust an Lichtintensität.

Während der skotophilen Phase kann mit relativ kurzen Störlichtzeiten gearbeitet werden; dieses gilt bei Hellrot wenigstens für den mittleren Teil jener Phase. Hierin liegt wohl auch der Grund, daß die meisten Störlichtversuche sich bisher auf diesen Bereich beschränkten. Auch die Aufhebung der Hemmung geschah mit kurzen Zeiten, so daß niemals der zulässige Zeitraum zwischen Hell- und Dunkelroteinstrahlung überschritten wurde. Zu Beginn und am Ende der Dunkelperiode ist die erforderliche Störlichtenergie besonders hoch. Hierfür mag zunächst die Überschreitung des Zeitintervalles verantwortlich sein, ferner muß

beachtet werden, daß diese Bereiche in den Übergang zwischen photo- und skotophiler Phase gehören, in dem die Prozesse sich überdecken können. Die Dunkelperiode fällt hier fast mit der skotophilen Phase zusammen. Das Maximum der Hemmwirkung liegt aber in der Mitte der skotophilen Phase, nicht in der Mitte der Dunkelperiode. Dies wurde bei einer Veränderung der Dunkelperiodenlänge in anderen Versuchen deutlich.

Auffallend ist der geradlinige Verlauf der Kurve, die durch Störung mit dunkelrotem Licht erhalten wurde (Abb. 8). Damit kann nur ausgedrückt werden, daß bei dieser Versuchsanordnung Dunkelrot keinen hemmenden Einfluß ausübte. Die Infloreszenzgröße der Pflanzen war die gleiche, die auch die Kontrollpflanzen ohne Störlicht aufwiesen. Es ist möglich, daß hier ein Sättigungseffekt vorliegt und dadurch keine Unterschiede der Infloreszenzgröße zu den einzelnen Zeitpunkten während der Dunkelperiode erkennbar werden. Den gleichen geradlinigen Kurvenverlauf erhielt man allerdings auch, wenn die Dunkelperiode statt 14 Std 10 oder 20 Std betrug; selbst dann zeigte Dunkelrot gegenüber ungestörten Dunkelkontrollen weder einen hemmenden noch einen fördernden Einfluß. Die Infloreszenzgröße erreicht nach Aufhebung der Hemmung nie jene Größe, wie sie die Kontrollgruppen ohne Störlicht aufwiesen. Wenn überhaupt eine Blüte ausgebildet wurde, so war diese stets wesentlich kleiner.

Störlichtversuche bei Kurztagpflanzen während der photophilen Phase sind mir nicht bekannt, nur zahlreiche Experimente mit Farblicht im Anschluß an eine weiße Hauptlichtperiode. Betrug deren Länge dann weniger als 10 Std, so konnte das Farblicht noch in die photophile Phase fallen. Jedoch ist hier eine Nachprüfung durch Blattbewegung nötig. WASSINK et al. (1951) geben für eine Kurztagpflanze an, daß diese im dunkelroten Licht, das anschließend an eine 8stündige Hauptlichtperiode gegeben wurde, verzögert blühte, dagegen nicht, wenn anschließend an die Hauptlichtperiode hellrotes Licht einstrahlte.

Bei den eigenen Störlichtversuchen während der photophilen Phase war zur Erzielung eindeutiger Effekte weit höhere Energie, damit also längere Störlichtdauer nötig als bei der Störung in der skotophilen Phase. Dadurch wurde der Zeitraum zwischen dem Beginn des hemmenden Dunkelrot und dem Beginn das aufhebenden hellroten Lichts möglicherweise größer als zulässig. Dies bedeutet eine Erhöhung der Grenzenergie Dunkelrot. Gegenüber den Versuchen in der skotophilen Phase bestand hier weiter der Nachteil, daß die Pflanzen auch nach Störlichtgabe im Weißlicht bleiben mußten, das den aufhebenden Hellrot- und in geringerer Menge auch den hemmenden Dunkelrotanteil enthielt. Hierdurch müßte eine weitere Erhöhung der Grenzenergie bedingt sein. Eine Verkürzung der Hauptlichtperiode derart, daß nach Störlichtgabe

Dunkelheit herrscht, konnte nicht erfolgen, da beide Farbbereiche für die Photosynthese unterschiedliche Bedeutung haben. Auch ein Vergleichsversuch mit Blaulicht als Hauptlichtperiode brachte keine Verbesserung. Es muß angenommen werden, daß wie in der skotophilen Phase (PARKER et al. 1946) auch hier Blaulicht, obwohl weit geringer, wirksam ist. Selbst die wesentlich längere Zeitdauer des hellroten Lichtes bei der Aufhebung der Grenzenergie kann so erklärt werden.

Ein Vergleich der Grenzenergien beider Phasen zeigt, daß in der photophilen Phase das absorbierende Pigmentsystem wesentlich stabiler ist und zur Umwandlung höhere Energie braucht als in der skotophilen Phase. Dies scheint erklärlich, denn bei Abwesenheit von Licht in der skotophilen Phase wirken schon geringe Lichtenergien störend, während in der photophilen Phase erst höhere Energie Einfluß erlangen kann.

Besonders in letzterer Phase macht sich die Begrenzung durch die Lichtintensität ungünstig bemerkbar. Diese Versuche müßten bei gleicher Energie, aber wesentlich kürzeren Störlichtzeiten durchgeführt werden, als es bisher möglich war. Ebenso wäre eine Ausdehnung dieser Experimente auf Langtagpflanzen interessant, doch auch dazu wäre wohl höhere Lichtintensität erforderlich.

Die kritische Tageslänge bei Farblicht hängt wohl von dem Hellrotanteil ab, der noch in die skotophile Phase fällt. Auch Blaulicht ist wirksam, nur viel geringer als Hellrot. Dunkelrot scheint die kritische Tageslänge nicht zu beeinflussen; der leichte Abfall der Infloreszenzgröße ist vielleicht dadurch erklärbar, daß das hellrotabsorbierende Pigment teilweise auch in den Bereich des dunkelroten Lichtes hinübergreift.

Die Übereinstimmung der Hemmungsmaxima mit den Gipfeln der photo- und skotophilen Phase ist so augenfällig, daß man eine Veränderung der absorbierenden Pigmente mit dem Wechsel der Phasen annehmen kann. In der photophilen Phase müßte demnach ein dunkelrotabsorbierendes Pigment vorherrschen, das zu einer Blühhemmung führt, die durch anschließend gebotenes Hellrot wieder rückgängig gemacht werden kann; während in der skotophilen Phase ein hellrot absorbierendes Pigment dominieren muß, das eine Blühhemmung bewirkt, die durch anschließendes Dunkelrot wieder aufgehoben werden kann. Eine Bestrahlung der Pflanzen mit dem antagonistischen Bereich vor Einwirkung des hemmenden hat keinen Einfluß. Über dies Pigmentsystem bestehen mehrere Hypothesen. Es wäre möglich, das bekannte Schema nach HENDRICKS and BORTHWICK 1954 auch auf die photophile Phase auszudehnen. Die Frage, ob ein oder zwei reversible Pigmentsysteme vorliegen, läßt sich durch diese Arbeit nicht klären und muß weiterhin offen bleiben.

Alle Ergebnisse dieser Arbeit sind nur vergleichend zu betrachten, da niemals mit absoluter Reinheit der Farbbereiche gerechnet werden kann; außerdem muß berücksichtigt werden, daß eine Überlagerung möglich ist. Diese Frage aber kann niemals durch ein Aktionsspektrum, sondern nur durch Ausmessung der Absorption der isolierten Pigmente in vitro geklärt werden.

Zusammenfassung

1. Es wurde bei der Kurztagpflanze *Chenopodium amaranticolor* die blühhemmende Wirkung des antagonistischen Hellrot-Dunkelrot-Bereiches (610—690 bzw. 705—980 mμ) untersucht und eine Beziehung zu der photo- und skotophilen Phase beobachtet.

2. Während der skotophilen Phase hemmt Hellrot die Ausbildung der Infloreszenz. Zur völligen Hemmung ist zu Beginn und zum Ende der photophilen Phase mehr, in deren Mitte ein Minimum an Energie erforderlich.

3. Dunkelrotes Licht hat während der skotophilen Phase keinen hemmenden Einfluß.

4. Dunkelrot vermag die Hemmwirkung durch Hellrot während der skotophilen Phase aufzuheben. Ließ man die Hemmung bis zu einem definierten Grenzpunkt erfolgen, so ist zur Aufhebung in jedem Zeitabschnitt der skotophilen Phase stets eine gleich große Energie erforderlich.

5. Der Zeitraum zwischen Hellrot- und Dunkelroteinstrahlung darf nicht größer als 60 min sein; darüber hinaus erfolgt ein merklicher Abfall.

6. Während der photophilen Phase hemmt dunkelrotes Licht die Infloreszenzausbildung. Um völlige Hemmung zu erreichen, ist zu Beginn und am Ende der photophilen Phase höhere Energie, in der Mitte ein Minimum an Dunkelrotenergie erforderlich.

7. Hellrot hemmt während der photophilen Phase nicht.

8. Hellrot vermag die Hemmwirkung durch Dunkelrot während der photophilen Phase aufzuheben. Erfolgte die Hemmung bis zu einem definierten Grenzwert, so war zur Aufhebung der Hemmung in jedem Zeitabschnitt der photophilen Phase die gleiche Energie erforderlich.

9. Die Dunkelrot-Energie, die zur völligen Hemmung in der Mitte der photophilen Phase nötig ist, beträgt etwa das Zehnfache der Hellrot-Energie, die zur völligen Hemmung in der Mitte der skotophilen Phase erforderlich ist. Dies mag z.T. auf den größeren, durch die Methode bedingten Fehlerquellen beruhen.

10. Die kritische Tageslänge ist bei *Chenopodium amaranticolor* je nach Farbqualität des gebotenen Lichts verschieden. Hierbei scheint der Hellrotanteil, der noch in die skotophile Phase fällt, eine wichtige Rolle zu spielen.

11. Die Ergebnisse aus den Störlichtversuchen über den Verlauf der endogenen Tagesrhythmik stimmen sehr gut mit denen überein, die man aus dem Verlauf der Blattbewegung erhält.

Für die Überlassung des Themas und für das stets rege Interesse am Fortgang der Arbeit möchte ich Herrn Professor Dr. BÜNNING herzlich danken.

Literatur

BORTHWICK, H. A., S. B. HENDRICKS and M. W. PARKER: The reaction controlling floral initiation. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. **38**, 929—934 (1952). — Photoperiodism. In: Radiation Biology (Hollaender), Bd. III, S. 479—517 (1956). — BÜNNING, E.: Endonome Tagesrhythmik und Photoperiodismus bei Kurztagspflanzen. Biol. Zbl. **61**, 161—183 (1944a). — Die allgemeinen Grundlagen der photoperiodischen Empfindlichkeit. Flora (Jena) **38**, 93—112 (1944b). — Die entwicklungsphysiologische Bedeutung der endogenen Tagesrhythmik bei den Pflanzen. Naturwiss. **33**, 271—275 (1946). — Entwicklungs- und Bewegungsphysiologie der Pflanze, 3. Aufl. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1953. — Endogenous rhythms in plants. Annual Rev. Plant Physiol. **7**, 71—90 (1956). — DOWNS, R. J.: Photoreversibility of flower initiation. Plant Physiol. **31**, 279 bis 284 (1956). — ELMSWELLER, S. L., N. W. STUART and J. W. BYRNES: Using a short interval of light during night to delay blooming of chrysanthemums. Bull. Chrys. Soc. Amer. **9**, 19—20 (1941). — GARNER, W. W., and A. H. ALLARD: Effect of the relative length of day and night and other factors of the environment on growth and reproduction in plants. J. Agricult. Res. **18**, 553—606 (1920). — The response of the plant to relative length of day and night. J. Agricult. Res. **23**, 871—920 (1923). — HAMNER, K. C., and J. BONNER: Photoperiodism in relation to hormones as factors in floral initiation and development. Bot. Gaz. **100**, 388—431 (1938). — HENDRICKS, S. B., and H. A. BORTHWICK: Photoperiodism in plants. Proc. 1. Internat. Photobiol. Congr., p. 23—35, 1954. — MURNEEK, A. E.: History of research in photoperiodism. Lotsya **1**, 39—61 (1948). — PARKER, M. W., S. B. HENDRICKS, H. A. BORTHWICK and N. J. SCULLY: Action spectrum for the photoperiodic control of floral initiation of short-day-plants. Bot. Gaz. **108**, 1—26 (1946). — PARKER, M. W., and H. A. BORTHWICK: Influence of light in plant growth. Annual Rev. Plant Physiol. **1**, 43—58 (1950). — RAZUMOV, I. V.: Significance of the night period for development of short-day and long-day plants. Sbornik Rabot Fiziol Rast. **4**, 283—298 (1941). — SALISBURY, F. B., and J. BONNER: The reactions of the photoinductive dark period. Plant Physiol. **31**, 141—147 (1956). — SCHWEMMLE, B.: Zur Temperaturabhängigkeit der Blütenbildung und der endogenen Tagesrhythmik bei Kalanchoë bloßfeldiana. Naturwiss. **44**, 356 (1957). — STOLWIJK, J. A.: Antagonistic effects of supplementary light of various wave length regions. 8. Congr. Internat. Bot. Sect. **11**, p. 320—321, 1954a. — Wave length dependence of photomorphogenesis in plants. Mededel. Landbouwh. Wag. Ned. **54**, 181—244 (1954b). — WASSINK, E. C., J. A. STOLWIJK and A. B. BEEMSTER: Dependence of formative and photoperiodic reactions on wave length and time of irradiation. Proc. Kon. Ned. Akad. Wetensch. **54**, 421—432 (1951). — On plants grown exclusively in light of restricted spectral regions. 8. Congr. Internat. Bot. Sect. 11, p. 310—318, 1954.

W. KÖNITZ,
Botanisches Institut der Universität Tübingen, Wilhelmstr. 5

Planta, Bd. 51, S. 30—48 (1958)

Aus dem Botanischen Institut der Universität Marburg a. d. Lahn

CHONDRIOSOMEN-, SPHÄROSOMEN- UND PROPLASTIDENZAHLEN IN BEZIEHUNG ZU DEN DIFFERENZIERUNGSVORGÄNGEN BEI DER ANTHERENENTWICKLUNG

Von

KURT STEFFEN und WALDTRAUT LANDMANN

Mit 2 Textabbildungen

(Eingegangen am 25. September 1957)

A. Einleitung

Bei der Antherenentwicklung der Balsamineen und Gentianaceen (STEFFEN u. LANDMANN 1957) lassen sich zwei zeitlich voneinander getrennte Umdifferenzierungsprozesse am gleichen Organ studieren. Durch den ersten Prozeß entstehen aus einem bereits spezialisiertem Gewebe Pollenmutterzellen und Tapetumgewebe, ohne daß diese Differenzierung an eine bestimmte Zellteilung gebunden ist.

Die zweite Differenzierung findet im haploiden Pollenkorn statt, wo durch eine inäquale Teilung die generative und die vegetative Zelle gebildet werden. Es war zu prüfen, inwieweit die entstandenen Zellen cytologisch unterscheidbar sind, wobei als neuer Gesichtspunkt die Verteilung der Proplastiden und der Organellgruppe: Chondriosomen/Sphärosomen beachtenswert erschien. MICHAELIS (1955b, 1957) sprach in anderem Zusammenhang den Verdacht aus, daß Plastiden und Sphärosomen als Träger von Plasmagenen durch somatische Umkombination an Differenzierungsprozessen beteiligt sein könnten. Da MICHAELIS von der einfachen Vorstellung ausgeht, daß die Partikelpopulationen in allen Zellen zahlenmäßig gleich sind und gleiche Vermehrungsgeschwindigkeit haben, war zu prüfen, wieweit die Voraussetzungen für eine statistische Behandlung dieses Problems gegeben sind. Im Zusammenhang mit den Untersuchungen von MICHAELIS über plasmatische Vererbung wurde die Frage akut, ob durch eine inäquale Teilung alle Zellorganelle in die entstehende kleine generative Zelle gelangen. Diese Frage ist von grundsätzlicher Bedeutung, da in letzter Zeit bei *Selaginella* und den *Filicinae* von YUASA nachgewiesen werden konnte, daß eine Übertragung von Plastiden durch die männlichen Gameten nicht erfolgt (vgl. STEFFEN 1955).

B. Ergebnisse

I. Technik

Schneide- und Färbetechnik entsprechen den früheren Angaben (STEFFEN u. LANDMANN 1957).

Für die quantitative Auswertung der Zahl der Proplastiden einerseits und der Chondriosomen- und Sphärosomen andererseits mußte eine Bezugsgröße gefunden

werden. Zum Auszählen wurde ein Okularmikrometer benutzt, das aus einem Quadratnetz besteht. Das Einzelquadrat besitzt bei der angegebenen Vergrößerung eine Seitenlänge von 5,7 μ. Es wurden jeweils 4 Einzelquadrate an Hand von Skizzen ausgezählt, d. h.: eine Fläche von rund 130 μ^2 (1. Bezugsgröße). Außerdem wurden die Zahlenwerte pro Zellanschnitt (2. Bezugströße) festgestellt. Durch Zwischenschaltung eines strengen Grünfilters wurde der Kontrast gesteigert. Das Primärgranum ließ sich nur ohne Filter feststellen. Aus einer bestimmten Anzahl von Zählungen pro Stadium und Gewebe (meist 10) wurde der Mittelwert M und dessen Streuung m berechnet. Die statistische Sicherung wurde (in allen Fällen) nach KUCKUCK-MUDRA (1950) durchgeführt.

Die Chondriosomen und Sphärosomen wurden gemeinsam ausgezählt, da es bisher nicht möglich ist, die beiden Zellorganelle in fixiertem Material anders als durch Unterschiede in der Farbintensität zu unterscheiden (PERNER 1953). Dieses Verfahren ist unsicher, wenn eine Lebendkontrolle wie bei unseren Objekten schwer oder gar nicht durchzuführen ist. Nach unseren Erfahrungen lassen sich beide Zellorganelle nach OsO_4- und Regaud-Fixierung mit der Färbung nach ALTMANN oder REGAUD darstellen. Dies ging eindeutig aus Vergleichszählungen der Zellorganelle hervor. Damit konnten die Angaben von BAUTZ (1955 a u. b, PERNER 1952 u. 1953 und SHAVER 1955) z. T. bestätigt und erweitert werden.

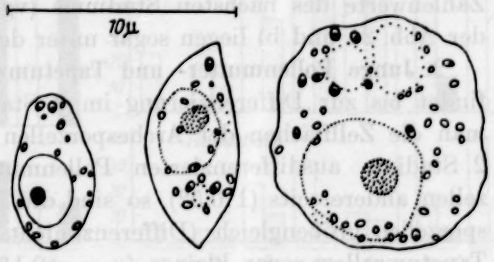


Abb. 1 a—c. *Impatiens glandulifera* ROYLE. Generative Zellen. a Aus dem jungen zweikernigen Pollenkorn; b Seitenansicht; c Aufsicht auf die generative Zelle des vakuolisierten Pollenkorns. Die tiefer gelegenen Kerne wurden im Umriß punktiert, die zugehörigen Nucleoli total punktiert gezeichnet

Da noch immer der Beweis der identischen Reduplikation der Sphärosomen aussteht, wird mit der Feststellung: die Summe der Chondriosomen und Sphärosomen hat sich erhöht, nichts über die Vermehrungsrate der einzelnen Organelle ausgesagt.

Um die erhaltenen Zahlenwerte in Beziehung zum Zellwachstum setzen zu können, wurde die Zellanschnittsfläche für jeden ausgewerteten Entwicklungszustand festgestellt. Hierzu wurden je 10 Anschnitte pro Zelltyp, Gewebe und Stadium mit Hilfe des Zeichenapparats auf Millimeterpapier gezeichnet, die Quadrate ausgezählt, M und m errechnet und statistisch gesichert.

II. Untersuchungen

Folgende Entwicklungsstadien wurden untersucht und quantitativ ausgewertet:

1. Sekundäre Archesporzellen.

Die Identifizierung der Proplastiden (mittlere Größe 0,7 × 0,6 μ) dieses Stadiums ist schwierig, da diese größenordnungsmäßig von den Chondriosomen und Sphärosomen (mittlere Größe 0,7 × 0,35 μ) kaum unterscheidbar sind. Aus den Meßwerten und der Abb. 12a der vorhergehenden Arbeit (STEFFEN u. LANDMANN 1957) ist zu ersehen, daß es sich in diesem Stadium nur um kugelige oder ellipsoidische Formen handelt. Die Proplastiden wurden durch das Primärgranum identifiziert, nach einiger Erfahrung waren sie schon durch die etwas stärkere Lichtbrechung zu

erkennen. (Vgl. auch STRUGGER 1954.) Die Größe der primären Grana ließ sich in den Zeichnungen nicht genau wiedergeben, wohl aber ihre Lage in der Proplastide.

Während Chondriosomen und Sphärosomen in Größe und Färbbarkeit einheitlich sind (was für jedes Stadium gilt), treten bei den Proplastiden in dem beschriebenen ersten Stadium stärkere Größenunterschiede auf. Diese Uneinheitlichkeit läßt auf asynchrones Wachstum und asynchrone Teilung schließen. Daß Teilungen der Zellorganelle stattfinden, ist zu fordern, da die Zahl der Archesporzellen bis zum nächsten Stadium durch Mitosen vermehrt wird. Die Teilungsrate der Zellorganelle ist jedoch nicht erhöht, sondern eher vermindert, denn die entsprechenden Zahlenwerte des nächsten Stadiums (vgl. die graphische Darstellung der Abb. 2a und b) liegen sogar unter dem des ersten.

2. Junge Pollenmutter- und Tapetumzellen. Eine Zellvergrößerung findet bis zur Differenzierung im 2. Stadium nicht statt. Vergleicht man die Zellflächen der Archesporzellen einerseits mit denen der im 2. Stadium ausdifferenzierten Pollenmutter- (1:1,15) und Tapetumzellen andererseits (1:0,52), so sind die Pollenmutterzellen den Archesporzellen größengleich (Differenz nicht zu sichern, $p = 17{,}9\%$), die Tapetumzellen sogar kleiner ($p = <0{,}1\%$). Letzteres muß durch ein geringeres Cytoplasmawachstum in den Tapetumzellen erklärt werden, da der Vakuolisierungsgrad in den Tapetumzellen größer als in den sekundären Archesporzellen und den Pollenmutterzellen ist. Auch wenn man die Inhomogenität des Materials berücksichtigt, bleibt dieser Unterschied signifikant. Die Zahl der Zellorganelle in sekundären Archesporzellen und Pollenmutterzellen ist praktisch gleich (vgl. die graphische Darstellung der Abb. 2a und b, Tabellen mit Zahlen- und p-Werten stehen auf Anforderung zur Verfügung). In den Tapetumzellen ist jedoch ihre Zahl gegenüber den Archesporzellen deutlich vermindert, was nicht allein durch die stärkere Vakuolisierung ersterer zu erklären ist, denn die Werte für Meßfläche und Zellanschnitt sind in den Tapetumzellen niedriger. Ob dies primär durch eine inäquale Verteilung oder sekundär durch eine unterschiedliche Teilungsintensität der Organelle bedingt ist, muß offenbleiben.

Die Proplastiden sind in Archespor-, Pollenmutter- und Tapetumzellen größengleich, die Mittelwerte der Chondriosomen und Sphärosomen scheinen in Pollenmutter- und Tapetumzellen kleiner zu sein.

Die Größe der Chondriosomen und Sphärosomen bleibt in allen Stadien gleich, während die Proplastiden sich im vorletzten der untersuchten Stadien vergrößern (s. dagegen PERNER und PFEFFERKORN 1953 an *Tradescantia* und *Saprolegnia*; auch GIRBARDT 1955).

3. Beginn der Reifeteilung. Im nächsten Stadium befinden sich die Pollenmutterzellen bereits in der Prophase der Meiosis, und zwar im Pachytän. In ihrem Cytoplasma finden sich kleine, wenig auffällige

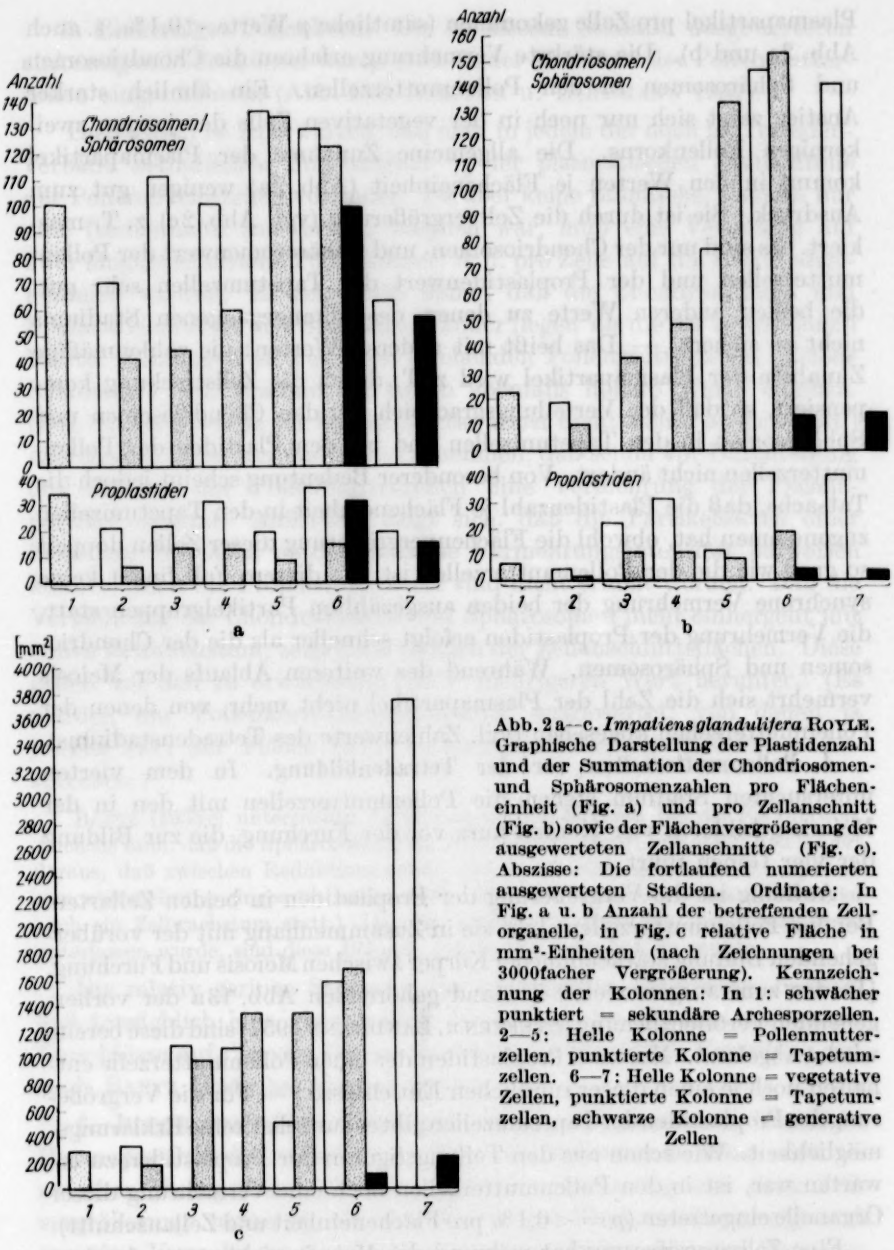


Abb. 2 a—c. *Impatiens glandulifera* Royle. Graphische Darstellung der Plastidenzahl und der Summation der Chondriosomen- und Sphärosomenzahlen pro Flächeneinheit (Fig. a) und pro Zellanschnitt (Fig. b) sowie der Flächenvergrößerung der ausgewerteten Zellanschnitte (Fig. c). Abszisse: Die fortlaufend numerierten ausgewerteten Stadien. Ordinate: In Fig. a u. b Anzahl der betreffenden Zellorganelle, in Fig. c relative Fläche in mm²-Einheiten (nach Zeichnungen bei 3000facher Vergrößerung). Kennzeichnung der Kolonnen: In 1: schwächer punktiert = sekundäre Archesporzellen. 2—5: Helle Kolonne = Pollenmutterzellen, punktierte Kolonne = Tapetumzellen. 6—7: Helle Kolonne = vegetative Zellen, punktierte Kolonne = Tapetumzellen, schwarze Kolonne = generative Zellen

Vacuolen im Gegensatz zu den jetzt zweikernigen Tapetumzellen, die durch starke Vacuolisierung charakterisiert sind.

Es ist — vermutlich noch vor der Reduktionsteilung (vgl. auch Wagner 1927 und Py 1932) — zu einer beträchtlichen Vermehrung der

Plasmapartikel pro Zelle gekommen (sämtliche p-Werte $<0{,}1\,\%$, s. auch Abb. 2a und b). Die stärkste Vermehrung erfahren die Chondriosomen und Sphärosomen in den Pollenmutterzellen. Ein ähnlich starker Anstieg zeigt sich nur noch in der vegetativen Zelle des jungen zweikernigen Pollenkorns. Die allgemeine Zunahme der Plasmapartikel kommt in den Werten je Flächeneinheit (Abb. 2a) weniger gut zum Ausdruck. Sie ist durch die Zellvergrößerung (vgl. Abb. 2c) z. T. maskiert. Es sind nur der Chondriosomen- und Sphärosomenwert der Pollenmutterzellen und der Proplastidenwert der Tapetumzellen sehr gut, die beiden anderen Werte zu denen des vorangegangenen Stadiums nicht zu sichern. — Das heißt mit anderen Worten: die zahlenmäßige Zunahme der Plasmapartikel wird z. T. durch die Zellstreckung kompensiert, so daß der Verteilungsgrad sich bei den Chondriosomen und Sphärosomen in den Tapetumzellen und bei den Plastiden der Pollenmutterzellen nicht ändert. Von besonderer Bedeutung scheint jedoch die Tatsache, daß die Plastidenzahl je Flächeneinheit in den Tapetumzellen zugenommen hat, obwohl die Flächenvergrößerung dieser Zellen doppelt so groß wie die der Pollenmutterzellen ist. In diesem Fall findet keine synchrone Vermehrung der beiden ausgezählten Partikelgruppen statt, die Vermehrung der Proplastiden erfolgt schneller als die der Chondriosomen und Sphärosomen. Während des weiteren Ablaufs der Meiosis vermehrt sich die Zahl der Plasmapartikel nicht mehr, von denen der Pollenmutterzellen abgesehen (vgl. Zahlenwerte des Tetradenstadiums).

4. Pollenmutterzellen vor der Tetradenbildung. In dem vierten untersuchten Stadium stehen die Pollenmutterzellen mit den in der Meiosis gebildeten vier Kernen kurz vor der Furchung, die zur Bildung der vier Gonen führt.

Auffällig ist die Vergrößerung der Proplastiden in beiden Zellarten. Bei den Pollenmutterzellen steht sie in Zusammenhang mit der vorübergehenden Bildung stärkeähnlicher Körper zwischen Meiosis und Furchung. [In der zum ausgewerteten Zustand gehörenden Abb. 13a der vorhergehenden Veröffentlichung (STEFFEN u. LANDMANN 1957) sind diese bereits wieder abgebaut. Nur zwei Proplastiden der einen Pollenmutterzelle enthalten noch je einen dieser rundlichen Einschlüsse.] — Für die Vergrößerung der Proplastiden der Tapetumzellen gibt es zunächst keine Erklärungsmöglichkeit. Wie schon aus den Teilungsfiguren der Proplastiden zu erwarten war, ist in den Pollenmutterzellen noch eine Vermehrung dieser Organelle eingetreten ($p = <0{,}1\,\%$ pro Flächeneinheit und Zellanschnitt).

Eine Zellvergrößerung hat während der Meiosis nicht stattgefunden. Der Wert für die Tapetumzellen liegt zwar höher als im Stadium 3, die Differenz läßt sich aber nicht sichern. Dies ist durch die starke Streuung ($m = \pm 189$) bedingt, die ihrerseits ein Ausdruck der unregelmäßigen Zellform ist.

5. Einkerniges Pollenkorn. Die in diesem Stadium ausgewerteten einkernigen Pollenkörner waren noch in der Membran der Pollenmutterzellen eingeschlossen (Abb. 13b, STEFFEN u. LANDMANN 1957).

Theoretisch ist zu erwarten, daß man in jedem der noch im Tetradenverband befindlichen Pollenkörner $^1/_4$ der plasmatischen Bestandteile der Pollenmutterzellen vorfindet. Da aber keine räumliche, sondern nur eine flächenhafte Auswertung möglich war, muß eine Verteilung auf zwei längsgeschnittene Pollenkörner, d. h. pro Zelle auf die Hälfte angenommen werden. Es zeigt sich daher, daß die Chondriosomen- und Sphärosomenwerte des Stadiums 5 höher liegen als die zu erwartenden Werte. Zählungen an sich eben furchenden Pollenmutterzellen (gleiche Schnittserie wie Stadium 5!) haben ebenfalls höhere Werte ergeben. (Das Stadium wurde für unsere Zwecke sonst nicht weiter ausgewertet.) Aus diesen Tatsachen muß man entnehmen, daß schon vor Durchteilung des Plasmas der Pollenmutterzellen eine Vermehrung der Plasmapartikel einsetzt. Außerdem zeigt sich, daß die Partikelsorten einer Zelle eine durchaus unterschiedliche Vermehrungsintensität aufweisen können, denn die Proplastidenwerte sind nicht erhöht worden. Daß die Vermehrung der Chondriosomen und Sphärosomen nicht einhergeht mit einem Zellwachstum, zeigen die Größen der Zellanschnittsflächen. Diese gehen auf den zu erwartenden 50% niedrigeren Wert herunter. (Es wurden nur Pollenkorn-Längsanschnitte ausgewertet, von denen ja jeweils zwei der Fläche einer Pollenmutterzelle des Stadiums 4 entsprechen.)

BAUTZ (1955c) untersuchte *Saccharomyces*-Bäckerhefen bei der Sporulation. Auch sie fand, daß die Sphärosomenzahl den Erwartungswert übersteigt und folgert daraus, daß zwischen Reduktionsteilung und Sporenbildung bereits eine Sphärosomenvermehrung eingesetzt haben muß. (Parallel zu diesem Vorgang fand hier auch ein Zellwachstum statt.) Da eine statistische Sicherung der Zahlenwerte unterlassen wurde, sind diese Befunde jedoch mit Vorbehalt zu werten.

Die relativ geringe Streuung der vorliegenden Mittelwerte beweist, daß tatsächlich eine gleichmäßige Verteilung des Plasmas und seiner Einschlüsse auf die vier Gonen erreicht wird (bezüglich Verteilung vgl. auch BAUTZ 1955c an *Saccharomyces*).

6. Junges zweizelliges Pollenkorn: Tapetum-Endstadium. Sämtliche Plasmapartikel der vegetativen Zelle des Pollenkorns haben sich inzwischen, bezogen auf den Zellanschnitt, gleichzeitig mit einer Zellvergrößerung vermehrt. In den Werten pro Flächeneinheit zeigt sich nur eine Vermehrung der Proplastiden; die Differenzen der Chondriosomen- und Sphärosomenwerte von Stadium 5 und 6 lassen sich nicht gegeneinander sichern. — In der generativen Zelle befinden sich (pro Anschnitt) 4 Proplastiden und 13 Chondriosomen und Sphärosomen im Mittel. Diese Zahlen werden bis zum nächsten Stadium nicht erhöht

(4 Proplastiden, 15 Chondriosomen und Sphärosomen im Mittel; Abb. 1a und b, c). — Die Chondriosomen und Sphärosomen der Tapetumzellen sind nicht mehr vermehrt worden (Differenzen zu der des vorigen Stadiums nicht gesichert), während sich die Proplastidenzahl noch erhöht hat (vgl. den vorhergehenden Abschnitt; Differenzen genügend und sehr gut gesichert).

7. Vacuolisiertes zweizelliges Pollenkorn. In der vegetativen und generativen Zelle hat keine Vermehrung der cytoplasmatischen Einschlüsse mehr stattgefunden. Wie schon erwähnt, zeigen Proplastiden, Chondriosomen und Sphärosomen die kleinsten Ausmaße innerhalb des gesamten Entwicklungsganges. Diese starke Verkleinerung sämtlicher Plasmapartikel ist zweifellos gleichzusetzen mit der vielfach erwähnten „Tendenz zur Granulierung" des Chondrioms dieses Stadiums in den klassischen Chondriosomenarbeiten.

Die niedriger liegenden Werte pro Flächeneinheit kommen bei beiden Zellen des Pollenkorns durch die Verteilung auf einen größeren Raum zustande (vgl. die Zellflächenwerte Abb. 12c; ferner Abb. 14a, b, STEFFEN u. LANDMANN 1957). Das unmittelbar folgende Stadium des zweikernigen, stärkehaltigen Pollenkorns kam nicht zur Auswertung, da dieses keine vergleichbaren Werte erbracht hätte. Die Ausbildung der Stärkekörner bewirkt eine flächenmäßig andere Verteilung aller Plasmaeinschlüsse als bisher (Abb. 14c, STEFFEN u. LANDMANN 1957).

RNS-Gehalt von Archespor und Tapetum. Da die Veränderungen im RNS-Gehalt im Antherengewebe von *Impatiens glandulifera* und *Gentiana cruciata* gleichsinnig verlaufen, gelten die folgenden Angaben für die beiden untersuchten Arten. — Die sekundären Archesporzellen heben sich von den übrigen Zellen (außer denen, die das Leitbündel bilden) deutlich durch ihre stärkere Plasmafärbbarkeit ab.

Nach Differenzierung von Tapetum und Pollenmutterzellen ist die Anfärbung der Pollenmutterzellen stärker geworden, doch wird der erhöhte RNS-Gehalt bis zum Beginn der Meiosis (Pachytän) wieder vermindert. Im Gegensatz dazu nimmt der RNS-Gehalt in den Tapetumzellen zu. Nicht selten sind die zur Loculusmitte gerichteten Zellteile besonders intensiv gefärbt (deutlich bei *Gentiana*).

Diese Verhältnisse bleiben unverändert bis zum Tetradenstadium. In der Pollenmutterzellmembran tritt eine unspezifische Pyroninanfärbung auf, die aber leicht als solche bei Ribonuclease-Behandlung erkannt wird.

Nach Freiwerden der Gonen aus dem Tetradenverband gleicht sich zunächst die Färbungsintensität in beiden Geweben an, indem die der Pollenkörner zu- und die der Tapetumzellen abnimmt. Bis zum Zustand des zweikernigen Pollenkorns ist die Anfärbung der Tapetumzellen sehr schwach geworden, während sie in vegetativer und generativer Zelle des

Pollenkorns jetzt das stärkste Ausmaß (entsprechend der des Tapetums z. Z. der Meiosis) erreicht.

III. Diskussion des Differenzierungsproblems

1. Archespor/Tapetum. *Plasmapartikelvermehrung in Beziehung zur Zellteilung und -differenzierung.* Bei normalen Cytokinesen werden nach Beobachtungen von Lewitsky (1910), Bowen (1929), Py (1932), Bauer (1942), Christiansen (1949), Strugger (1954) und Fasse-Franziskет (1955) alle plasmatischen Bestandteile annähernd gleichmäßig auf die Tochterzellen verteilt. (Übereinstimmende Befunde ergaben sich auch an tierischen Objekten, z. B. Nakahara 1952, Gross und Mayer 1953.)

Wann die Teilung der Plasmapartikel stattfindet und wieweit diese vom Zellzustand oder vom Mitosecyclus beeinflußt wird, ist unbekannt. Wenn die an zoologischen Objekten gewonnenen Ergebnisse übertragbar sind, darf angenommen werden, daß die Chondriosomenvermehrung in der Interphase stattfindet (Agrell 1954, 1955; Gustafson 1954, dort Literatur).

Die begrenzte Anwendbarkeit der Kern-Plasma-Relation und die erst neuerdings erkannte Bedeutung der Mitochondrien und Sphärosomen haben Lettre und Lettre (1953) zur Aufstellung einer Kern-Plasma-Mitochondrien-Relation veranlaßt. Danach ist der Plasmazuwachs der Summe von Kern- und Mitochondrienzuwachs proportional. Beim Zellwachstum kommt es nach den Verff. zu einer asynchronen Plasma- und Kernvolumenzunahme.

Die Teilungsbereitschaft der Zelle wird nach Ansicht der Verff. von der Aktivität der Mitochondrien beeinflußt. Einer Auslösung der Zellteilung wirken Zahl und Aktivität der Mitochondrien entgegen. Umgekehrt erhöht sich die Teilungswahrscheinlichkeit, je geringer bei gleichbleibendem Plasma- und Kernvolumen die Aktivität der Mitochondrien wird.

Auf die quantitativen Untersuchungen an *Impatiens* sind diese Überlegungen nur bedingt anwendbar, da man nicht ohne weiteres Kern-, Plasma- und Mitochondrienzuwachs vor der Mitose mit dem vor der Meiose vergleichen kann.

Mit Hilfe der oben angeführten Relation für die Teilungswahrscheinlichkeit einer Zelle ist es möglich, einen Erklärungsversuch für die Stabilität der zweikernigen Tapetumzellen von *Impatiens* zu geben. Kern- und Plasmawachstum haben sich erhöht, entsprechend dem Plasmazuwachs hat sich die Chondriosomenzahl vervielfacht, und solange diese beiden Größen sich entsprechen, ist die Teilungswahrscheinlichkeit gering.

Es ist zu unterscheiden zwischen einer Partikelvermehrung vor Beginn der Zellteilung und der Veränderung der Organellzahl in spezialisierten Geweben.

Bei *Impatiens glandulifera* läßt sich bei oder nach folgenden Vorgängen eine Vermehrung feststellen:

1. Bei allen Organellarten nach Konstituierung der endgültigen Zahl der sekundären Archesporzellen pro Loculus und nach Ausdifferenzierung der Pollenmutterzellen sowie der Tapetumzellen. Gleichzeitig erfolgt eine Zellvergrößerung. — Ferner zu Beginn der Meiosis bei den Proplastiden der Pollenmutterzellen ohne einhergehende Zellvergrößerung (Stadien 1—4).

2. Bei den Chondriosomen und Sphärosomen der Pollenmutterzellen vor der Furchung und den Chondriosomen und Sphärosomen der Tapetumzellen, ohne daß die Zellen sich vergrößern (Stadium 4).

3. Während der Zellvergrößerung vor und nach der 1. Pollenkornmitose in der vegetativen Zelle bei allen Zellorganellen; im Tapetum steigt die Proplastidenzahl pro Zellanschnitt ohne gleichzeitige Zellvergrößerung an.

Das Verhalten der Proplastiden der Pollenmutterzellen von *Impatiens* (unter 1 und 3) läßt sich mit dem der Proplastiden von *Agapanthus* vergleichen. Ihre Vermehrung zu Anfang der Meiosis wäre als Reaktion auf die vorangegangene Zellstreckung zu deuten. FASSE-FRANZISKET (1955) fand nämlich für die Mesophyllzellen von *Agapanthus*, daß das Maximum der Zellstreckung vor der Hauptvermehrung der Proplastiden liegt. — Abweichend, jedoch wegen der vermutlich beginnenden Degeneration des Tapetums schlecht zu beurteilen, ist das Verhalten der Proplastiden im Tapetum von *Impatiens*.

Allgemein läßt sich folgendes sagen: Während der Zellteilungen im Archespor kann es schwerlich zu einer Erhöhung der Zahl von plasmatischen Bestandteilen pro Zelle kommen, da zunächst dafür gesorgt werden muß, daß nach jeder Teilung die ursprüngliche Anzahl der Organelle wieder erreicht wird. Dies wird durch die Zahlenwerte des Stadium 2 bestätigt. Nach Abschluß dieser Teilungen kommt es zur Ausdifferenzierung des Tapetums und der Pollenmutterzellen. Im Stadium 2, in dem diese beiden eben differenzierten Zelltypen vorliegen, läßt sich bei den Pollenmutterzellen bereits eine vermehrte Zahl von Organellen verglichen mit der Zahl in den Tapetumzellen feststellen. Eine Aussage darüber, welcher Vorgang die Ursache und welcher die Folge der Differenzierung war, kann nicht gemacht werden. — Beide Zelltypen vergrößern sich, wobei der Anteil des Plasmazuwachses und der der Wasseraufnahme nicht zu bestimmen ist. Mit der Vergrößerung geht eine statistisch gesicherte Vermehrung aller Plasmapartikel einher. Sie erreicht in den beiden Zelltypen weder den gleichen absoluten noch relativen Wert. Hiernach ließe sich an die Möglichkeit einer Korrelation zwischen Plasmawachstum und Partikelvermehrung denken. Die

Vermehrung der Chondriosomen und Sphärosomen in der furchungsbereiten Pollenmutterzelle und im Tapetum scheint jedoch völlig „autonom", ohne eine solche Korrelation von Plasma- und Partikelvermehrung vor sich zu gehen. Die Zunahme in den Tapetumzellen zwischen Stadium 2 und 3 steht offenbar in Beziehung zur freien Kernteilung, durch die die Zellen zweikernig und stärker herangewachsen sind als die Pollenmutterzellen.

Die Frage, ob in Zusammenhang mit einer Vermehrung der Chromatinmenge die Anzahl der cytoplasmatischen Bestandteile von der Zelle „aufreguliert" wird, ist akut. Die Ergebnisse von YAMASAKI (1954) an Farnen scheinen dafür zu sprechen. Es wurden nämlich statistisch zu sichernde Zahlenunterschiede der Chloroplasten normaler und colchicinierter Zellen beobachtet (die Größenunterschiede konnten wegen zu geringen Zahlenmaterials nicht gesichert werden).

Auch von MOCHIZUKI und SUEOKA (1955) konnte an polyploiden Epidermiszellen von Zuckerrübenblättern nach Ausschaltung der Variationsmöglichkeiten, die durch Blattalter, -entwicklung und Ernährungsbedingungen gegeben sind, mit zunehmender Chromosomenzahl ein Ansteigen der Chloroplastenzahl festgestellt werden. Für die Zunahme der Chloroplastengröße in Beziehung zum Polyploidiegrad wurden gleichfalls keine gesicherten Werte erhalten. Ebenfalls für eine solche Aufregulierung sprechen die Befunde von STEFFEN (1954): Hochpolyploide Haustorienzellen von *Veronica agrestis* weisen eine erhöhte Zahl von Chondriosomen und Sphärosomen ($M = 88{,}2 \pm 2{,}47$) gegenüber den Endospermzellen ($M = 57{,}2 \pm 1{,}53$) auf. Auch dieser Zahlenunterschied ist signifikant.

Nach der Kern-Plasma-Mitochondrien-Relation von R. und H. LETTRE (1953) ist — wie erwähnt — der Plasmazuwachs gleich der Summe des Kern- und Mitochondrienzuwachses. Da es bei der Auswirkung von Polyploidisierungsvorgängen augenscheinlich nur auf den erreichten Polyploidiegrad, nicht auf die Art der Polyploidisierung (Restitutionskernbildung, Endomitose usw.), also auf die Chromatinmasse ankommt, erscheint es berechtigt, auch die polyenergiden Zellen mit in diese Betrachtungen einzubeziehen. Hat die Chromatinsubstanz pro Zelle (wie z. B. im Tapetum von *Impatiens*) durch freie Kernteilung zugenommen, so erfolgt eine Cytoplasmavermehrung. Da aber aus stoffwechselphysiologischen Gründen nach den genannten Autoren eine Plasmavermehrung eine Erhöhung der Mitochondrienzahl nach sich zieht, müßte letztere pro Zelle erheblich sein. In welchem Zeitraum und von welchen Sekundärfaktoren beeinflußt eine solche Mitochondrienvermehrung stattfindet, ist unbekannt. Nach anfänglich nur geringer Vermehrung der Mitochondrien (Stadium 3 zu 4) bei vorherrschender Plasmavermehrung, erfolgt bis zum Stadium 5 ohne Zellvergrößerung

ein starker Zuwachs. Ob man diese zeitliche Differenz zwischen Cytoplasmawachstum und Mitochondrienvermehrung im Sinne von R. und H. LETTRE werten darf, bleibt offen.

Zelldifferenzierung durch Plasmonumkombination? MICHAELIS (1955a, b) stellte, von der Plasmavererbung ausgehend, die Theorie eines neuen genetischen Systems auf, in dem Kern- und Plasmagene (das sind die in den verschiedenen Plasmapartikeln lokalisierten Erbträger) zu einem funktionellen Erbsystem zusammengefaßt sind. Dieses genetische System stellt aber nicht nur die Summe aller Erbträger, sondern ein harmonisch aufeinander abgestimmtes Wechselspiel, ein „Reaktionsnetz", und damit eine sinnvolle Ordnung dar. Da die Eigenart der einzelnen Erbträger erblich festgelegt ist, wird dieses harmonische Reaktionssystem unter der Voraussetzung vererbt, daß die plasmatischen Bestandteile auf die Tochterzellen zufallsgemäß verteilt und identisch reproduziert werden, was für die Sphärosomen und eventuelle submikroskopische Plasmapartikel noch unbewiesen ist. — Sichere Aussagen darüber, auf welche Weise Kern- und Plasmaerbträger zu einem solchen System vereinigt werden, sind nicht möglich. Es gibt Fälle, in denen eine normale artspezifische Entwicklung durch die im Gleichgewicht befindlichen Quantitäten der Kern- und Plasmagenwirkung zustande kommt, wie z. B. bei *Epilobium*. Dieses Gleichgewicht kann beispielsweise durch Kreuzung gestört werden. Es kann aber auch bei der Ontogenese der Pflanze durch inäquale Verteilung der Plasmapartikel oder durch unterschiedliche Wachstums- und Teilungsgeschwindigkeit der Zellorganelle eine Plasmonumkombination erfolgen. Dabei entstehen Plasmonunterschiede innerhalb eines Organs oder eines Gewebes, oder wie MICHAELIS (1955a) meint, auch in zeitlicher Folge an demselben Organ, wie z. B. bei den Jugend- und Folgeblättern.

In unserem Zusammenhang sind zwei Fragen wichtig: 1. ob eine Beziehung zwischen Gewebedeterminierung und -differenzierung einerseits und Plasmonumkombination andererseits besteht oder bestehen kann (vgl. dazu auch BARTELS 1956), und 2. ob die Verteilung der Plasmapartikel in den haploiden Zellen der in den diploiden entspricht, eine Frage, die für die plasmatische Vererbung wichtig ist.

Bei dem 1. Differenzierungsvorgang, der Bildung der Tapetum- und Pollenmutterzellen, muß eine zufallsgemäße Verteilung der Plasmapartikel angenommen werden, da besondere Mechanismen für eine inäquale Teilung der Mutterzellen und damit auch eine ungleiche Verteilung der Zellorganelle nicht gefunden wurden. Es müßte überlegt werden, ob etwa infolge eines Aussortierungsprozesses eine Plasmonumkombination durch die vorhergehenden Zellteilungen erfolgt sein kann, die in diesem Stadium erst manifest und damit sichtbar wird. Da bis zur Differenzierung aus den Archesporzellen höchstens 7 Teilungsfolgen

abgelaufen sind, kann bei den hohen Zahlenwerten der Plasmapartikel (Proplastiden etwa $2n = 20$, Chondriosomen und Sphärosomen etwa $2n = 65$ pro Zelle) keine vollständige Entmischung innerhalb beider Partikelgruppen stattgefunden haben, sondern höchstens eine Umkombination der hypothetisch genunterschiedenen Partikelsorten. Unter der einfachst möglichen Voraussetzung, daß nur zwei genetisch unterschiedene Partikelsorten vorhanden sind, deren Mischungsverhältnis nicht bekannt ist, kommt es nach $n \cdot 10$* Zellteilungen zur vollständigen Entmischung und zur manifesten Plasmonmutation (MICHAELIS 1955a, b). Wenn die Annahme von MICHAELIS richtig ist, daß sich ein Plasmonkonstituent schon bei seiner Anreicherung manifestieren kann (MICHAELIS 1955a), läßt sich bei nicht lagegemäß bedingten Differenzierungsprozessen (wie beim Balkentapetum) die Mitwirkung eines solchen Mechanismus nicht ganz ausschließen. Die Determinierung würde also dann bei einer bestimmten Konzentration des Plasmakonstituenten erfolgen, sie würde schrittweise durch die Cytokinesen vorbereitet und nicht durch einen einzigen Teilungsschritt bedingt sein. Wenn dem so wäre, müßten alle die Fälle mit diesem Mechanismus unerklärbar bleiben, bei denen durch eine bestimmte eingeschaltete Wand eine lagemäßig definierte, nicht willkürliche Ausbildung von zwei differenten Zelltypen erfolgt (vgl. Histogendifferenzierung, Entwicklung im Moossporogon). BARTELS (1956) nimmt für diese Art der Determinierung die Hypothese eines radiären Gradienten zu Hilfe. Betrachtet man die Verhältniszahlen Proplastiden zu Chondriosomen und Sphärosomen derselben Zelle in verschiedenen Stadien der Entwicklung, so zeigt sich, daß die Vermehrung der beiden Partikelgruppen unterschiedlich schnell erfolgt. Diese Tatsache darf bei einer theoretischen Betrachtung als möglicher komplizierender Faktor einer Plasmonumkombination nicht außer acht gelassen werden. Denn was bei den verschiedenen Populationen möglich ist, wäre auch innerhalb der Populationen vorstellbar, wodurch also sekundär zahlenmäßige Verschiebungen in der Partikelfraktion erfolgen können.

RNS-Gehalt. Die im Laufe der Antherenentwicklung von *Gentiana* und *Impatiens* auftretenden Veränderungen des RNS-Gehaltes der verschiedenen Zelltypen stehen wahrscheinlich wie die zahlenmäßigen Unterschiede ihrer Partikelpopulationen in Beziehung zur Differenzierung. Schon die sekundären Archesporzellen sind durch stärkere Plasmafärbbarkeit innerhalb des übrigen Antherengewebes ausgezeichnet. Im Moment der Determination und Differenzierung von Tapetum- und Pollenmutterzellen treten weitere Unterschiede auf. Die Pollenmutterzellen sind jetzt intensiver als die Tapetumzellen gefärbt. (Gleichzeitig sind Kern- und Nucleolusvergrößerung sowie [bei *Impatiens*]

* n = halbe Zahl der Partikel pro Zelle

erhöhte Zahl von Zellorganellen gegenüber den Tapetumzellen zu konstatieren.) Der unterschiedliche RNS-Gehalt liefert also ein weiteres Charakteristikum für beide Zelltypen, erlaubt jedoch ebenfalls keine Aussage darüber, ob Differenzierung oder Nucleinsäuresynthese der primäre Vorgang war, zumal bereits das sekundäre Archespor eine erhöhte Menge RNS gegenüber den somatischen Zellen der Anthere aufweist.

Die im weiteren Entwicklungsablauf vorkommenden Veränderungen decken sich mit den Angaben für *Rhoeo discolor* (PAINTER 1943) und für die Pollenkornentwicklung von *Lilium longiflorum* (OGUR et al. 1951). Während der Zellvergrößerungsphase bis zum Beginn der Meiosis in den Pollenmutterzellen verändert sich die Plasmafärbbarkeit in den beiden Zellarten gegenläufig mit dem Resultat, daß nun die Pollenmutterzellen äußerst schwach und die Tapetumzellen sehr stark färbbar sind. PAINTER möchte die geringe Basophilie des Plasmas in den Pollenmutterzellen dadurch erklären, daß während der Meiosis RNS in den Kern überführt wird. Die Zunahme des Färbungsgrades der Tapetumzellen läßt sich zugleich mit der Partikelvermehrung in Verbindung zur Endomitose bzw. freien Kernteilung bringen. Durch die Polyploidisierung erfolgt eine Vermehrung der Nucleolussubstanz. Diese wiederum ist nach CASPERSSON Voraussetzung für eine Anreicherung der RNS im Cytoplasma und ein vermehrtes Plasmawachstum. — Mit dem Freiwerden der jungen Pollenkörner aus dem Tetradenverband wird das Pollenkornplasma zunehmend stärker färbbar, während die Tapetumzellen an Färbungsintensität verlieren. (Gleichlautende Beobachtungen bei LA COUR 1949.) PAINTER ist der Ansicht, daß in der Mikrospore RNS auf Kosten des Tapetums für das bevorstehende Pollenschlauchwachstum angehäuft wird, was durch die stetig abnehmende Plasmafärbung der Tapetumzellen demonstriert wird.

2. Generatives/vegetatives Plasma. (Inäquale Teilung und Beziehung zur plasmatischen Vererbung.) Im Pollenkorn von *Impatiens* liegen nach der 1. Mitose folgende Verhältnisse vor:

a) Vegetative und generative Zelle sind größenverschieden, besitzen also unterschiedliche Plasmamengen.

b) Die Plasmafärbung der generativen Zelle mit Pyronin ist im jungen Pollenkorn zunächst schwach, wird später jedoch intensiver. Im älteren Pollenkorn ist die Beurteilung der Färbungsintensität schwierig, da im vegetativen Plasma Vacuolen auftreten. Nach Rückbildung der zentralen Vacuole ist die Anfärbbarkeit in der vegetativen und generativen Zelle gleich stark.

c) Generativer und vegetativer Kern haben verschiedene Größe und unterschiedliche Struktur.

d) Der Nucleolus des vegetativen Kernes ist größer als der des generativen; er zeigt häufig Vacuolisierung.

e) Die beiden Zellen besitzen verschieden große Plasmapartikel, deren Zahl pro Zellanschnitt unterschiedlich ist.

Nach LA COUR (1949) sind die Unterschiede in der Plasmaqualität und -quantität durch die Teilungsspindel bedingt, die durch ihre Stellung die Entstehung verschieden großer Zellen und durch ihre Bildung in den vorher in der vegetativen Zelle entstandenen hyalinen, RNS-freien Bezirk den qualitativen Unterschied bewirkt. Damit wird ein stoffliches Gefälle, eine Polarität im vegetativen Plasma vorausgesetzt (auch BÜNNING 1953, GEITLER 1955, LINDEMANN 1956, HOLDEN u. MOTA 1956). Abnorme Pollenkornentwicklung durch eine um 90° gedrehte Spindelstellung, wobei die Kerne in gleichwertiges Plasma gelangen und infolgedessen die Differenzierung unterbleibt, scheinen dies zu bestätigen (LA COUR, LINDEMANN). Bei dieser Fehlentwicklung wird keine Vacuole gebildet. Dies wird von LA COUR in Verbindung mit Cytoplasmagranula gebracht, die in diesem Fall erhalten bleiben. LA COUR nimmt für diese Körper Proteinnatur an; nach PFEIFFER (1950) und den Beobachtungen an *Impatiens* könnte es sich jedoch um Kohlenhydratgranula handeln. Falls zwischen diesen und dem osmotischen Wert des Pollenkornplasmas ein Zusammenhang bestehen sollte, ist das Ausbleiben der Vacuolenbildung und der Vergrößerung des Pollenkorns vielleicht durch das Fehlen osmotisch wirksamer Substanz zu erklären. — Bei den bisherigen Überlegungen ist angenommen worden, daß die Vacuolenbildung in der vegetativen Zelle die Voraussetzung für die Kernverlagerung und damit für die normale Pollenkornentwicklung ist. Diese Beziehung muß jedoch nicht bestehen, wie bereits bekannt ist (Literatur bei STEFFEN 1956) und sich auch bei *Impatiens* zeigte.

Andere Erklärungsversuche für das Zustandekommen der plasmatischen Unterschiede in vegetativer und generativer Zelle sind folgende:

Nach GEITLER (1955, dort frühere Literatur) geht das Plasma fast vollständig aus dem Material der Teilungsspindel hervor, während es nach HAGERUP (1938) auf die Karyolymphe des primären Mikrosporenkerns zurückzuführen sein soll. Die qualitative Beschaffenheit des Plasmas bedingt nach GEITLER das Verhalten und die Struktur der Kerne.

Die cytologischen Untersuchungen an der generativen und vegetativen Zelle des Pollenkorns von *Impatiens* brachten folgende Ergebnisse:

Die beiden Zellen enthalten nach der Teilung Plastiden unterschiedlicher Größe; die der generativen Zelle sind die kleinsten der bei *Impatiens* überhaupt nachgewiesenen. Die vegetative Zelle enthält sowohl kleine als auch durch Stärkebildung vergrößerte Proplastiden.

Wenn die Unterschiede im Cytoplasma der beiden Zellen die Kernstruktur verändern (PINTO-LOPES 1948), wäre ein gleichartiger Einfluß auf die übrigen Zellorganelle denkbar. Durch die stärkere Viscosität

des generativen Plasmas könnten auch die Proplastiden sekundär verändert (entquollen, vgl. dazu SCHÜRHOFF 1924, MENKE 1934 und MUDRACK 1956 über die Quellbarkeit und konzentrationsabhängige Formveränderlichkeit der Plastiden) werden. Dafür spricht auch die Verkleinerung der Chondriosomen und Sphärosomen in der generativen Zelle. Eine andere Erklärungsmöglichkeit wäre durch die Lage der verschieden großen Plastiden in der vegetativen Zelle vor der Mitose gegeben: die vergrößerten Proplastiden befinden sich nämlich hauptsächlich im Zentrum des Pollenkorns, während die kleinen gleichmäßig über die gesamte vegetative Zelle verteilt sind. Möglicherweise gelangen aus diesem Grunde nur kleine Proplastiden in die generative Zelle hinein. — Mit diesem letzten Erklärungsversuch wird die Frage aufgeworfen, ob es bei der Pollenkornmitose zu einer Verteilung qualitativ unterschiedener Plastiden kommt. Das unbekannte Kohlenhydrat wird von allen Plastiden gebildet. Vorübergehend auftretende Größenunterschiede mögen mit dem Abbau des Reservestoffes zusammenhängen. An der Bildung der Stärke sind dagegen nicht alle Plastiden beteiligt. Es muß gefragt werden, ob nur die nicht stärkebildenden kleinen in die generative Zelle gelangen oder hier etwa die größeren, stärkebildenden in ihrer Größe reduziert werden. Für letztere Annahme spricht die Tatsache, daß außer den Proplastiden auch die Chondriosomen und Sphärosomen verkleinert sind, so daß diese Unterschiede wohl ganz allgemein auf den Einfluß des Plasmas zurückgeführt werden müssen. — Daß in der generativen Zelle niemals Stärkebildung beobachtet wurde, ist kein Grund, den Plastiden die Potenz dazu abzusprechen.

Die Überlegungen bezüglich der möglichen qualitativen Verschiedenheiten der Plasmapartikel in den beiden Zellen des Pollenkorns berühren gleichzeitig die Frage nach dem Verteilungsmechanismus bei der inäqualen Teilung, der die zahlenmäßigen Unterschiede bedingt. Eine ungleiche Verteilung der Partikel kann 1. durch eine polarisierte Lagerung und entsprechende Wandausbildung bedingt sein. Sie könnte auch 2. dadurch zustande kommen, daß sämtliche im zukünftigen Spindelraum gelegenen Zellorganelle durch die Bildung und Verbreiterung der Spindel in den bei der Mitose unbeteiligten Plasmaraum abgedrängt werden. 3. kann auch an eine zufallsgemäße, aber zahlenungleiche Verteilung gedacht werden, die durch das Herausschneiden eines kleinen Bezirks aus dem großen Pollenkorn bedingt ist. Zur Klärung dieser Frage tragen die an *Impatiens* ermittelten Zahlenwerte bei:

Wie erwähnt, sind diese pro Zellanschnitt für die beiden Zellen verschieden. Ermittelt man jedoch diejenigen für die Flächeneinheit, so zeigt sich, daß sie gleich sind (Differenzen der Werte für die generative Zelle zu denen der vegetativen Zelle nicht gesichert). Dies bedeutet, daß sich der Gehalt an Zellorganellen pro Flächeneinheit nicht geändert hat,

so daß man tatsächlich von einem „Herausschneiden" eines sehr kleinen vegetativen Plasmateiles durch die uhrglasförmige Wand sprechen kann. Eine weitere wichtige Tatsache ergibt sich bei Ermittlung der Verhältniswerte für die Partikelgruppen jeder Zelle, das Verhältnis Proplastiden:Chondriosomen und Sphärosomen ist in vegetativer und generativer Zelle ebenfalls gleich!

	Zellanschnitt	Flächeneinheit
generative Zelle:	1:3,19	1:3,15
vegetative Zelle:	1:3,57	1:3,54

Erstaunlich ist jedoch, daß diese Verhältniswerte mit denen der Ausgangszellen (sekundäre Archesporzellen) gleichfalls übereinstimmen (1:3,38; 1:2,92)!

Die 1. Pollenkornmitose ist also in bezug auf die Zahl, aber nicht auf die Relation inäqual, was beinhaltet, daß vor der Teilung eine zufallsgemäße und nicht etwa polarisierte Verteilung der Plasmapartikel bestanden haben muß.

Durch die Aufrechterhaltung der Relation wird die Konstanz der Übertragung beider Partikelfraktionen in die Eizelle gesichert und gleichzeitig das für die Aktionsbereitschaft einer Zelle notwendige Partikelverhältnis erhalten.

Daß Übertragung des generativen Plasmas in die Eizelle stattfindet, kann nicht mehr bezweifelt werden (Steffen 1951 für *Impatiens glandulifera*).

Nach Michaelis manifestiert sich ein Plasmakonstituent erst, wenn er in einer bestimmten Konzentration vorliegt. Änderungen dieser Konzentration kommen durch unterschiedliche Teilungsrate des mutierten Plasmakonstituenten oder durch Umkombination innerhalb des Plasmons zustande. Die Plasmonumkombination durch normale Cytokinesen führt nur zu einem geringen Prozentsatz mutierter Zellen. Letzterer wird mit der Zahl der abgelaufenen Zellteilungen größer. Durch die inäquale Teilung mit ihrer verminderten Organellzahl erhöht sich die Möglichkeit zur Manifestierung eines Plasmonkonstituenten. Mit abnehmender Partikelzahl wird nämlich die Kombination auf wenige und einfachere Verhältniszahlen beschränkt, die vielen Zwischenwerte bei den Plasmonumkombinationen durch Cytokinesen fehlen. Die Wahrscheinlichkeit, daß durch einen Teilungsschritt ein Konstituent eliminiert wird, ist wesentlich erhöht.

Die vorliegende Untersuchung hat gezeigt, daß die Partikelzahlen in den Zellen in Zusammenhang mit der Differenzierung variieren können. Will man also aus ihnen mit Michaelis die Wahrscheinlichkeit einer Plasmonumkombination berechnen, so muß man für ihre Bestimmung möglichst wenig spezialisierte Zellen wählen. Bei der

Beurteilung der Erfolgsaussichten für eine Plasmonumkombination nach Kreuzung muß berücksichtigt werden, daß die Zahl der Zellorganelle in den haploiden generativen Zellen auf ein Zehntel herabgesetzt ist. Die Chancen für eine Manifestierung eines mutierten Plasmonkonstituenten können aber erst beurteilt werden, wenn die Partikelzahlen in der haploiden Eizelle und damit die Ausgangsrelation in der Zygote bekannt sind. Das aber ist eine Aufgabe zukünftiger Untersuchungen und gemeinsames Arbeitsfeld für den Cytomorphologen und den Plasmongenetiker.

Zusammenfassung

In Zusammenhang mit der Entwicklungsgeschichte werden die morphologischen und zahlenmäßigen Veränderungen der Chondriosomen, Sphärosomen und Proplastiden in Archespor-, Pollenmutter- und Tapetumzellen anhand von 7 aufeinanderfolgenden Stadien untersucht. Dabei ergibt sich: Nach Zellteilungen tritt eine Vermehrung von Zellorganellen bis zur Partikelzahl der Mutterzelle auf. Darüber hinaus finden sich erhöhte Organellzahlen (im Gegensatz zu den Tapetumzellen) in den Pollenmutterzellen vor der Meiosis und der Tetradenbildung sowie in den Pollenkörnern nach der 1. Pollenkornmitose. Die Teilung der beiden Organellarten muß nicht gleichzeitig erfolgen, wie aus ihrem Verhalten vor oder während der Furchung zu schließen ist. — Es wird angenommen, daß während der Meiosis keine Organellvermehrung stattfindet. — Die 1. Pollenkornmitose ist nur in bezug auf die Zahl der Plasmapartikel pro Zelle inäqual; die Verteilung letzterer pro Plasmaeinheit wird durch die Cytokinese nicht geändert, und auch das Verhältnis Proplastiden:Chondriosomen und Sphärosomen innerhalb der generativen Zelle entspricht dem in der vegetativen Zelle sowie dem in den Ausgangszellen (sekundäre Archesporzellen). — Der RNS-Gehalt der Tapetumzellen, der anfangs geringer als der der Pollenmutterzellen war, wird zunächst bis zur Ausbildung der vier Gonen erhöht und sinkt dann (z. Z. des Pollenkornwachstums) ab. Der RNS-Gehalt der Pollenmutterzellen steigt kontinuierlich an, der der generativen Zelle ist zunächst niedriger als in der vegetativen Zelle, wird jedoch später erhöht. — Die Kern-Plasma-Mitochondrien-Relation von R. und H. LETTRE wird auf die quantitativen Untersuchungen anzuwenden versucht. Dabei werden die zeitliche Aufeinanderfolge der Partikelteilung und des Plasmawachstums und die Relation zwischen Chromatingehalt und Organellzahl berücksichtigt. Die Bedeutung der inäqualen Teilung für die Plasmonumkombination nach MICHAELIS wird diskutiert.

Die Verff. danken der Deutschen Forschungsgemeinschaft und Herrn Prof. Dr. A. PIRSON für ihre Unterstützung.

Literatur

AGRELL, I.: A mitotic gradient in the sea-urchin embryo during gastrulation. Ark. Zool. (Stockh.), Andra Ser. **6**, 213—217 (1954). — A mitotic rhythm in the appearance of mitochondria during the early cleavage of the sea urchin embryo. Exper. Cell Res. 8, 232—234 (1955). — BARTELS, F.: Abnorme Epidermisausbildung bei einer Plasmonabänderung von Epilobium hirsutum als Beitrag zum Determinationsproblem. Ber. dtsch. bot. Ges. **69**, 375—380 (1956). — BAUER, L.: Untersuchungen zur Entwicklungsgeschichte und Physiologie der Plastiden von Laubmoosen. Flora (Jena) **136**, 38—84 (1942). — BAUTZ, E.: Über Mitochondrienfärbungen an höheren Pilzen. Ein Beitrag zur Mitochondrienforschung bei Pflanzen-Zellen. Naturwiss. **42**, 619—622 (1955a). — Cytologische Untersuchungen an höheren Pilzen. Ber. dtsch. bot. Ges. **68**, 197—204 (1955b). — Die Verteilung der Plasmagranula bei der Sporenbildung von Saccharomyces-Bäckerhefen. Z. Naturforsch. **10b**, 313—316 (1955c). — BOWEN, R. H.: The distribution of the plastidome during mitosis in plerome-cells of Ricinus. Cellule **39**, 123—156 (1929). — BÜNNING, E.: Entwicklungs- und Bewegungsphysiologie der Pflanze. Springer: Berlin-Göttingen-Heidelberg 1953. — CHRISTIANSEN, E. G.: Orientation of the mitochondria during mitosis. Nature (Lond.) **163**, 361 (1949). — FASSE-FRANZISKET, U.: Die Teilung der Proplastiden und Chloroplasten bei Agapanthus umbellatus L'Herit. Protoplasma (Wien) **45**, 194—227 (1955). — GEITLER, L.: Normale und pathologische Anatomie der Zelle. In Handbuch der Pflanzenphysiologie, Bd. 1, S. 123—167. 1955. — GIRBARDT, M.: Lebendbeobachtungen an Polystictus versicolor (L.). Flora (Jena) **142**, 540—564 (1955). — GROSS, R., u. A. MAYER: Verhalten der Granula in Knochenmarkzellen während der Teilung. Naturwiss. **40**, 202—203 (1953). — GUSTAFSON, T.: Enzymatic aspects of embryonic differentiation. International review of cytology, vol. III, p. 277—320. 1954. — HAGERUP, O.: A peculiar asymmetrical mitosis in the microspore of Orchis. Hereditas (Lund) **24**, 94—96 (1938). — HOLDEN, J. W. H., and M. MOTA: Non-synchronised meiosis in binucleate pollen mother cells of an Avena hybrid. Heredity (Lond.) **10**, 109—117 (1956). — KUCKUCK, H., u. A. MUDRA: Lehrbuch der allgemeinen Pflanzenzüchtung. Stuttgart: S. Hirzel 1950. — LA COUR, L. F.: Nuclear differentiation in the pollen grain. Heredity (Lond.) **3**, 319—337 (1949). — LETTRE, H., u. R. LETTRE: Kern-Plasma-Mitochondrien-Relation als Zellcharakteristikum. Naturwiss. **40**, 203 (1953). — LEWITSKY, G.: Über die Chondriosomen in pflanzlichen Zellen. Ber. dtsch. bot. Ges. **28**, 538—546 (1910). — LINDEMANN, R.: Vergleichende cytologische Untersuchungen an den Liliaceen Bellevalia romana, Agapanthus umbellatus und Lilium regale. Planta (Berl.) **48**, 2—23 (1956). — MENKE, W.: Chloroplasten-Studien. Protoplasma (Wien) **21**, 279—298 (1934). — MICHAELIS, P.: Plasma-Vererbung. In Handbuch der Pflanzenzüchtung, 2. Aufl., Bd. I. 1955a. — Über Gesetzmäßigkeiten der Plasmon-Umkombination und über eine Methode zur Trennung einer Plastiden-, Chondriosomen-, bzw. Sphärosomen(Mikrosomen)- und einer Cytoplasmavererbung. Vorläufige Mitt. Cytologia (Tokyo) **20**, 315—338 (1955b). — MICHAELIS, P.: Genetische, entwicklungsgeschichtliche und cytologische Untersuchungen zur Plasmavererbung. II. Mitteilung: Über eine Plastidenmutation mit intracellulärer Wechselwirkung der Plastiden, zugleich ein Beitrag zur Methodik der Plasmonanalyse und zur Entwicklungsgeschichte von Epilobium. Planta (Berl.) **50**, 60—106 (1957). — MOCHIZUKI, A., and N. SUEOKA: Genetic studies on the number of plastid in stomata. I. Effects of autopolyploidy in sugar beets. Cytologia (Tokyo) **20**, 358—366 (1955). — MUDRACK, K.: Experimentelle Untersuchungen an isolierten Chloroplasten. Protoplasma (Wien) **46**, 556—578 (1956). — NAKAHARA, H.: Behavior of the mitochondria in cell division, with evidence concerning the kinetic function. Cytologia (Tokyo) **17**, 168—178 (1952). — OGUR, M., O. ERICKSON,

G. U. ROSEN, K. B. SAX and C. HOLDEN: Nucleic acids in relation to cell division in Lilium longiflorum. Exper. Cell Res. **2**, 73—89 (1951). — PAINTER, T. S.: Cell growth and nucleic acids in the pollen of Rhoeo discolor. Bot. Gaz. **105**, 58—68 (1943). — PERNER, E. S.: Zellphysiologische und zytologische Untersuchungen über den Nachweis und die Lokalisation der Cytochrom-Oxydase in Allium-Epidermiszellen. Biol. Zbl. **71**, 43—69 (1952). — Die Sphärosomen (Mikrosomen) pflanzlicher Zellen. (Sammelreferat unter Berücksichtigung eigener Untersuchungen). Protoplasma (Wien) **42**, 457—481 (1953). — PERNER, E. S., u. O. PFEFFERKORN: Pflanzliche Chondriosomen im Licht- und Elektronenmikroskop unter Berücksichtigung ihrer morphologischen Veränderung bei der Isolierung. Flora (Jena) **140**, 98—129 (1953). — PFEIFFER, H. H.: Polarisationsmikroskopische Messungen an Mikrosporenmutterzellen von Tradescantia paludosa. Protoplasma (Wien) **39**, 277—282 (1950). — PINTO-LOPES, J.: On the differentiation of the nuclei in pollen grains of angiosperms. Portugal. Acta Biol., Ser. A **2**, 237—247 (1948). — PY, G.: Recherches sur l'assise nourricière de microspores et en particulier sur le comportement des constituants morphologiques du protoplasme. Rev. gén. Bot. **44**, 316—413, 450—462, 484—512 (1932). — SCHÜRHOFF, P. N.: Die Plastiden. In K. LINSBAUER, Handbuch der Pflanzenanatomie, Bd. 1. 1924. — SHAVER, J. R.: The distribution of mitochondria in sea urchin embryos. Experientia (Basel) **11**, 351—353 (1955). — STEFFEN, K.: Zur Kenntnis des Befruchtungsvorganges bei Impatiens glanduligera LINDL. Cytologische Studien am Embryosack der Balsamineen. Planta (Berl.) **39**, 175—244 (1951). — Cytological observations on endosperm haustories. 8. Congr. Internat. de Bot. Paris 1954, Sect. 8, 250. — Entwicklungsgeschichte und Fortpflanzung. Fortschr. Bot. **17**, 51—106 (1955). — Der männliche Gametophyt. In P. MAHESHWARI, Manual of angiosperm embryology. 1956 im Druck. — STEFFEN, K., u. W. LANDMANN: Entwicklungsgeschichtliche und cytologische Untersuchungen am Balkentapetum von Gentiana cruciata L. und Impatiens glandulifera ROYLE. Planta (Berl.) **50**, 423—460 (1957). — STRUGGER, S.: Die Proplastiden in den jungen Blättern von Agapanthus umbellatus L'HERIT. Protoplasma (Wien) **43**, 120—173 (1954). — WAGNER, N.: Sur les chondriosomes et les plastides pendant la formation du pollen chez Veratrum album L. Mem. Soc. Nat. Kiew **25** (1915). Zit. nach GUILLIERMOND 1924. — YAMASAKI, N.: Über den Einfluß von Colchicin auf Farnpflanzen. I. Die jungen Prothallien von Polystichum craspedosorum DIELS. Cytologia (Tokyo) **19**, 249—254 (1954).

Prof. Dr. KURT STEFFEN,
Pharmakognostisches Institut der Technischen Hochschule Braunschweig, Pockelstr. 4

Dr. WALDTRAUT LANDMANN,
Institut für Entwicklungsphysiologie, Köln-Lindenthal, Gyrhofstr. 17

Planta, Bd. 51, S. 49—62 (1958)

Aus dem Botanischen Institut der Universität Heidelberg

EIN BEITRAG ZUR METHODE DER QUANTITATIVEN CHLOROPHYLLBESTIMMUNG*

Von

HEINZ FALK

Mit 3 Textabbildungen

(Eingegangen am 17. Oktober 1957)

Die pflanzenphysiologische Forschung am Botanischen Institut der Universität Heidelberg hatte sich vor nunmehr über 20 Jahren zur Aufgabe gestellt, Beziehungen zwischen dem Chlorophyllgehalt der Pflanzen und den verschiedensten inneren und äußeren Faktoren aufzudecken. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen haben ihren Niederschlag in einer Reihe von Veröffentlichungen gefunden (s. SEYBOLD u. Mitarb. 1937 bis 1956). Zur Auffindung solcher Gesetzmäßigkeiten waren naturgemäß umfangreiche quantitative Chlorophyllanalysen erforderlich, wobei die Analysenmethode dem Seriencharakter dieser Bestimmungen angepaßt sein mußte. Hierzu erschien die Photometrie der vorher säulenchromatographisch getrennten und gereinigten, gelösten Pigmentkomponenten als geeignetes Hilfsmittel; auch heute noch bedient man sich gerade für mikroanalytische Vorhaben mit Vorliebe optischer Methoden.

Für die damaligen Messungen stand ein Pulfrich-Photometer zur Verfügung, das Durchlässigkeitsablesungen auf visuellem Wege mit einer Genauigkeit von ± 1—2% erlaubte. Zur Eichung dieses Instrumentes waren Lösungen von Chlorophyll a bzw. b bekannter Konzentration erforderlich, die durch Einwaage selbst hergestellter Präparate und nachfolgendes definiertes Lösen in Diäthyläther gewonnen wurden, wie bei SPOHN (1935) und SEYBOLD und EGLE (1937) beschrieben ist. Die auf diese Weise erlangten Eichwerte lagen allen bis 1956 aus dem Heidelberger Institut veröffentlichten Untersuchungen, die auf quantitativen Chlorophyllanalysen fußen, zugrunde.

Die Vervollkommnung methodischer Hilfsmittel, vor allem apparativtechnischer Art, gestattete nun die lange beabsichtigte Überprüfung und gegebenenfalls Revision der seinerzeit ermittelten Eichwerte und ermöglichte den Vergleich mit denjenigen amerikanischer Autoren, vor allem SMITH und BENITEZ (1955), deren Werte in „PAECH-TRACEY: Moderne Methoden der Pflanzenanalyse" Eingang gefunden haben und damit als Standardwerte für quantitative Bestimmungen gelten können,

* Auszug aus einer Dissertation 1957.

vorausgesetzt, daß die Aufarbeitungsmethode mit der dort beschriebenen identisch ist. Da diese Voraussetzung für die bislang bei uns durchgeführten Bestimmungen jedoch nicht zutrifft, ein Vergleich somit nicht ohne weiteres möglich ist, mußte eine Neubestimmung der quantitativen Extinktionsspektren der Chlorophylle nach den hier üblichen Aufarbeitungsmethoden unternommen werden. Die Gewinnung der spektroskopisch reinen Komponenten a und b ist gegenüber der bei SMITH und BENITEZ (1955) geschilderten Anweisung stark vereinfacht, so daß eine ausführlichere Darstellung nützlich erscheint.

Für die Untersuchungen kam ein Unicam-Spektralphotometer SP 500 zum Einsatz, das für das nahe ultraviolette und sichtbare Spektralgebiet als Lichtquelle eine spannungsstabilisierte Wolframlampe benutzt und mit Quarz-Einfachmonochromator ausgestattet ist. Der Empfängerteil besteht in einem RCA I P 28 Sekundärelektronenvervielfacher mit Zusatzgerät für die verschiedenen Hilfsspannungen (RSV SZG 500). Die Prüfung des Monochromators auf richtige Wellenlängeneichung geschah durch Austausch der eigentlichen Lichtquelle durch eine Hg-Lampe, von der 10 Emissionslinien zwischen 390,64 nm[1] und 579,06 nm vermessen wurden (Soll-Wellenlängenwerte nach WEIGERT 1927). Zur Kontrolle der Zuverlässigkeit der Durchlässigkeits-Potentiometerteilung diente ein Glasstandard mit ausgeprägtem Absorptionsspektrum im sichtbaren Bereich. Um Änderungen des Brechungsindex durch wechselnden Feuchtigkeitsgehalt im Medium des Strahlenganges zu vermeiden, mußte eine Trockenpatrone mit Blau-Silicagel von Zeit zu Zeit erneuert werden. Die in dieser Weise vorgenommene Justierung und Wartung des Photometers verminderte die Apparatefehler auf ein hinreichend kleines Maß.

Die Bestimmung des spezifischen Extinktionsspektrums eines Pigmentes läuft letztlich auf die Ermittlung des Extinktionskoeffizienten α für einen bestimmten Wellenlängenbereich bei einer Lösungskonzentration von 1 g/L hinaus, wofür das Lambert-Beersche Gesetz

$$E = \log \frac{I_0}{I} = \alpha\, c\, d$$

die zahlenmäßige Beziehung liefert.

Diese Beziehung gilt streng genommen nur für monochromatisches Licht, so daß zunächst geprüft werden muß, ob die gerätebedingte Monochromasierung der gestellten Bedingung genügt. Durch Extinktionsmessungen definierter Verdünnungsreihen einer Chlorophyll-Lösung konnte dies für den vorliegenden Fall mit ausreichender Genauigkeit bestätigt werden.

Die Größen E und d der Formel sind direkt meßbar, während die Konzentration c für die Errechnung von α bestimmt werden muß. Hierfür bieten sich beim Chlorophyll mehrere Methoden:

I. Einwaage des kristallisierten Produktes und definierte Lösung.

II. Magnesiumbestimmung der Chlorophyllprobe und Errechnung der Lösungskonzentration aus der gefundenen Mg-Menge mittels des Mol.-Gewichtes von Chlorophyll a bzw. b.

[1] 1 nm = 1 Nanometer = $1 \cdot 10^{-9}$ m = 1 mμ.

Die Magnesiumbestimmung war als *Mikroanalyse* auszuführen, da es aus verschiedenen Gründen nicht empfehlenswert schien, allzu große Mengen Chlorophyll aufzuarbeiten. In der chemischen Literatur finden sich 3 Mg-Mikrobestimmungsmethoden:

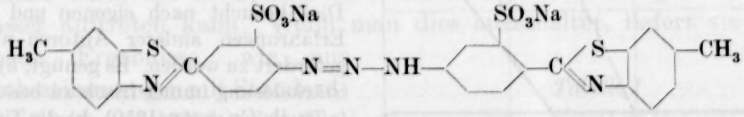
1. Colorimetrie mit Tropaeolin 00 (LANGE 1956),

2. Colorimetrie mit Titangelb (LANGE 1956, BUSSMANN 1956, LUDWIG und JOHNSON 1942, SMITH und BENITEZ 1955),

3. Komplexometrie (SCHWARZENBACH und BIEDERMANN 1948).

Der Einsatz mehrerer Verfahren sollte die Sicherheit der Bestimmungen erhöhen. Daher gelangten 2. und 3. zur Ausführung, nachdem 1., die als die empfindlichste Methode angegeben wird, trotz aller Sorgfalt bei den in der Vorschrift genannten Mg-Mengen keine Fällung erbrachte. Die colorimetrische Bestimmung von Mg mit Titangelb beruht auf folgendem Prinzip:

$Mg(OH)_2$ bildet mit Titangelb



eine rotgefärbte Adsorptionsverbindung, die mit Hilfe eines Schutzkolloides in Lösung gehalten werden kann. Die kolloidale Lösung wird gegen eine Blindlösung ohne Mg bei einer Wellenlänge zwischen 540 und 550 nm colorimetriert. Die verschiedenen Autoren benutzen als Schutzkolloid entweder lösliche Stärke oder neuerdings Polyvinylalkohol, manche arbeiten ohne, andere mit Zusatz von Ca^{++}-Ionen zur Farbvertiefung. Die Brauchbarkeit der verschiedenen Vorschriften wurde für die bei den Chlorophyllbestimmungen zu erwartenden Mg-Mengen an Mg-Standardlösungen festgestellt.

Die Herstellung dieser Lösungen erfolgte durch genaue Einwaage (Mikrowaage) von spektral reinem Magnesium (10—20 mg) der Fa. Schuchardt, München, das mit der äquivalenten Menge n H_2SO_4 gelöst und auf 1000 ml mit H_2O aufgefüllt wurde. Zur Aufbewahrung der Lösungen dienten Jenaer Glas- oder Polyäthylenflaschen. Von Zeit zu Zeit wurde ihr Mg-Gehalt komplexometrisch, wie noch zu beschreiben sein wird (S. 53), nachbestimmt.

Die von BUSSMANN (1956) angegebene Methode ist für die quantitative Mg-Analyse in Pflanzenaschen entwickelt. Sie arbeitet mit Polyvinylalkohol ohne Ca^{++}. Die große Zahl störender Fremdionen wird durch Komplexbildung maskiert. Da die Chlorophylle keine derartigen Metallionen außer Mg enthalten, wurden die betreffenden Zusätze durch aliquote Mengen Wasser ersetzt. Die Methode ist für Messungen bei 3 cm Schichtdicke recht gut geeignet. Da uns jedoch nur Cuvetten mit 1 cm zur Verfügung standen, war eine geeignetere Vorschrift auszuwählen,

die sich bei SMITH und BENITEZ (1955) fand. Sie stellt eine Modifizierung derjenigen von LUDWIG und JOHNSON (1942) und GRANICK (1950) dar und ist bei PAECH-TRACEY (1955) eingehend beschrieben, so daß sich eine Wiederholung an dieser Stelle erübrigt. Einige Einzelheiten, die in der obigen Arbeit keine Erwähnung gefunden haben, seien jedoch mitgeteilt, obwohl sie zwar dem Mikroanalytiker, nicht immer jedoch dem Botaniker geläufig sind.

1. Es empfiehlt sich, das für das Ansetzen der Lösungen, zum Verdünnen und Waschen benutzte Wasser stichprobenweise auf seine einwandfreie Beschaffenheit, am besten durch Leitfähigkeitsmessung zu untersuchen, da gewöhnliches destilliertes Wasser neben Kupfer oft Spuren gerade an Mg und Ca enthält.

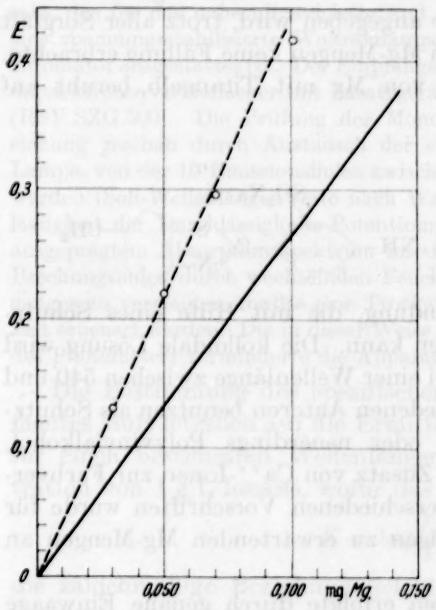


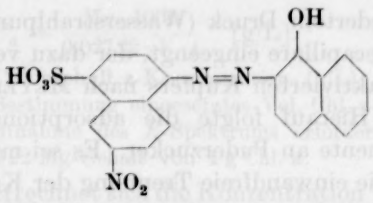
Abb. 1. Eichkurven für die colorimetrische Magnesium-Mikrobestimmung mit Titangelb.
——— Schutzkolloid: lösl. Stärke, Merck.
– – – – Schutzkolloid: 2% Polyvinylalkohol

2. GLEMSER und DAUTZENBERG (1952) empfehlen für die gute Reproduzierbarkeit der Analysen die tägliche Erneuerung aller Reagenslösungen. Dies braucht nach eigenen und den Erfahrungen anderer Autoren nicht gefordert zu werden. Es genügt, a) die Stärkelösung immer frisch zu bereiten (s. auch GRANICK 1950), b) die Titangelblösung im Dunkeln bei 0° C aufzubewahren (s. auch BUSSMANN 1956), c) die Natronlauge carbonatarm herzustellen.

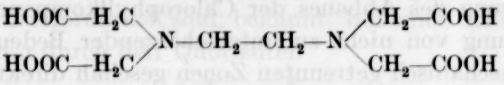
Unter Beachtung aller für mikroanalytische Arbeiten notwendigen allgemeinen Vorsichtsmaßnahmen und genauer Pipettierung der Reagenslösungen wurde die von SMITH und BENITEZ (l. c.) gefundene Eichkurve für die Mg-Bestimmung gleichfalls erhalten. Die Fehlergrenze beträgt im Bereich 0,07—0,10 mg $\pm$ 2,5%.

Der Ersatz von Stärkelösung durch 2% Polyvinylalkohol unter Beibehaltung der übrigen Anordnung erhöhte die Extinktionswerte bei den vorliegenden Mg-Mengen sehr stark, so daß keine genaue Ablesung auf der logarithmischen Skala des Instrumentes möglich war (vgl. Abb. 1). Es sei jedoch auf die hohe Empfindlichkeit dieser Methode hingewiesen, die damit weiterer Bearbeitung wert ist.

Die zweite Möglichkeit der Mg-Mikrobestimmung, nämlich die Komplexometrie, ist die analytisch einfachste. Die zu untersuchende Lösung wird auf einen geeigneten p_H-Wert (10, Ammonchlorid-Ammoniak) gepuffert und ein Metallindikator (Eriochromschwarz T)



zugegeben, der mit Mg^{++} einen lockeren, weinroten Komplex bildet. Hierauf titriert man mit m/1000 „Komplexon III" [Dinatriumsalz-Dihydrat der Äthylendiamintetraessigsäure (EDTA)]



Dabei wird das Mg^{++}-Ion aus dem Indicatorkomplex ins Komplexonat überführt. Ist dies quantitativ geschehen, schlägt der Indicator nach rein blau um. Die Methode hat den Nachteil, daß sie durch Ca^{++} beeinflußt wird, das in Spuren als Verunreinigung in Reagentien und Wasser auftreten kann. Wenn man dies ausschaltet, liefert sie sehr genaue Ergebnisse, wie aus Testbestimmungen mit Standard-Mg-Lösung ersichtlich wird (Tabelle 1).

Tabelle 1

Vorgelegt mg · 10^{-3}/15 ml	Gefunden mg · 10^{-3}	Fehler %
73,0	72,4	−0,8
73,0	71,9	−1,5
42,0	42,2	+0,5

Eine Titereinstellung ist bei Komplexon III p. a. laut Vorschrift nicht erforderlich, da genaue Einwaage der bei 40° C getrockneten Substanz den Faktor 1,000 ergibt, wie durch Kontrollen bestätigt werden konnte. Die Methode wurde mit 0,01 m Komplexon III in sonst gleicher Weise zur Ermittlung des Mg-Gehaltes länger aufbewahrter Standardlösungen für die Bestimmung mit Titangelb verwendet (vgl. S. 51).

Nach Erprobung der mikroanalytischen Möglichkeiten der Mg-Konzentrationsbestimmung und Feststellung ihrer Fehlerbreite konnte der nächste Schritt zur Festlegung der spez. Extinktionskurve der Chlorophylle getan werden, nämlich die Messung der Extinktionsspektren reiner Chlorophyllpräparate.

Die Aufarbeitung und Trennung der Blattpigmente erfolgte gemäß der im Botanischen Institut Heidelberg seit vielen Jahren erprobten und geübten Arbeitsvorschrift (Seybold und Egle 1937) mit einigen geringfügigen Veränderungen. Chlorophyllanalysen der letzten Jahre an verschiedensten Pflanzen ergaben für Chl. a und b immer die gleichen Spektren, so daß für die Gewinnung der beiden Komponenten das Ausgangsmaterial belanglos erscheint. In unserem Falle kamen die Blätter von *Lolium perenne* L. zur Verwendung. Die methanolischen Extrakte

wurden bei vermindertem Druck (Wasserstrahlpumpe) unter Einleiten von N_2 in die Siedecapillare eingeengt, der dazu verwendete technische Stickstoff mittels aktivierten Kupfers nach MEYER und RONGE (1939) O_2-frei gemacht. Hierauf folgte die adsorptionschromatographische Trennung der Pigmente an Puderzucker. Es sei mit Nachdruck darauf hingewiesen, daß die einwandfreie Trennung der Komponenten a und b mit Hilfe von Petroläther, der 0,2—0,3% Methanol enthält, an einer *einzigen* Säule möglich ist, sofern das Gemisch immer frisch angesetzt wird, eine Tatsache, die neben der Ersparnis an Zeit und Arbeitsaufwand zur Verhinderung des Abbaues der Chlorophyllkomponenten während der Aufarbeitung von nicht zu unterschätzender Bedeutung ist. Die Elution der mechanisch getrennten Zonen geschah direkt mit peroxydfreigemachtem, entsäuertem und getrockneten Äthyläther, wobei Chlorophyll a mit *tintenblauer* Farbe, Chlorophyll b rein grün in Lösung ging. Verfährt man nach der Originalvorschrift und eluiert mit Methanol, aus dem das Pigment durch Wasserzusatz in Äther übergetrieben wird, so bleiben Spuren von Methanol im Äther zurück, die beim Chlorophyll a eine blaugrüne Lösungsfarbe bedingen. „Blaugrün" hat zur Charakterisierung der a-Komponente allgemein in der Literatur Eingang gefunden (vgl. WILLSTÄTTER und STOLL 1913, S. 46; EGLE 1955, S. 565).

Die auf die beschriebene Weise erhaltenen chromatographisch reinen Komponenten konnten nun sofort oder nach höchstens 12stündiger Aufbewahrung im Dunkeln bei 0° C der Aufnahme ihrer Extinktionsspektren zugeführt werden. Hierzu war meist Verdünnung eines Anteils auf das 3—5fache notwendig, da die Konzentration der Originallösungen 3 bis 4 mg/250 ml betrug, ihr theoretischer Mg-Gehalt also im optimalen Bestimmungsbereich liegen mußte. Daraus resultiert der in der späteren Berechnung (vgl. S. 55) auftretende Verdünnungsfaktor f. Die Aufnahme der Spektren wurde in 1 cm Cuvetten in Diäthyläther vorgenommen, die mit eingeschliffenem Glasstöpsel verschlossen waren, um das Verdampfen von Lösungsmittel während der Messung zu vermeiden.

Nach Einengen der Originallösung auf rd. 5 ml und Überführung in einen Platintiegel unter mehrmaligem Nachwaschen mit kleinen Ätherportionen erfolgte der weitere Arbeitsgang zur Mg-Bestimmung genau nach der Vorschrift von SMITH und BENITEZ (l. c.). Zur Vermeidung von Verlusten durch Verspritzen während des Abrauchens mit 0,3 n H_2SO_4 ist die Verwendung eines Quarzoberflächenverdampfers zu empfehlen, der das Auftreten von Stellen lokaler Überhitzung am Tiegelboden verhindert. Der Mg-Gehalt des auf diese Weise gewonnenen Mg-Sulfates kann dann nach einer der beiden beschriebenen Methoden ermittelt werden. Der gefundene Mg-Wert, in g ausgedrückt, ermöglicht die Feststellung der Chlorophyll-a-Konzentration in g/L für die Probe, deren Spektrum gemessen wurde, nach folgender Beziehung:

$$C_a = \frac{\text{Mg} \cdot 1000}{0{,}027\,22 \cdot V \cdot f} \quad [\text{g/L}].$$

Hierin bedeutet C_a Chlorophyll a-Konzentration [g/L]; Mg gefundener Mg-Gehalt [g]; V zur Mg-Bestimmung eingesetztes Vol. Chl. a-Lösung [ml]; f Verdünnungsfaktor (zur Aufnahme des E-Spektrums erforderlich gewesene Verd. d. Originallösung); 0,027 22 Mg-Gehalt von 1 g Chl. a.

In gleicher Weise errechnet sich die Konzentration von Chlorophyll b:

$$C_b = \frac{\text{Mg} \cdot 1000}{0{,}026\,845 \cdot V \cdot f} \quad [\text{g/L}].$$

Damit sind alle Größen, die für die Berechnung von α im Lambert-Beerschen Gesetz erforderlich sind, bekannt. Bei einer Schichtdicke von 1 cm ergibt sich α durch den Quotienten

$$\alpha_\lambda \,{}^{1\,\text{g/L}}_{1\,\text{cm}} = \frac{E}{C\,[\text{g/L}]}.$$

Eine Umrechnung des „spezifischen" in den „molaren" Extinktionskoeffizienten ist leicht möglich. Da der E-Koeffizient von der Wellenlänge abhängig ist, muß obige Berechnung für jede Wellenlänge, bei der E gemessen wurde, durchgeführt werden. Hieraus resultieren die

Tabelle 2

I	II	III	IV
Vers. Nr.	Mg erwartet mg · 10^{-3}	Mg gefunden mg · 10^{-3}	Abweichung mg · 10^{-3}
	Chlorophyll a		
1a Titangelb	27,1	25,0	—2,1
2a Titangelb	99,1	97,5	—1,6
3a Titangelb	123,2	122,5	—0,7
4a Titangelb	75,1	77,5	+2,4
7a Komplexon	86,8	89,65	+2,85
	Chlorophyll b		
1b Titangelb	69,5	64,0	—5,5
2b Titangelb	81,5	74,0	—6,5
3b Titangelb	123,8	122,0	—1,8
4b Titangelb	80,8	81,0	+0,2
8b Komplexon	42,0	45,05	+3,05

beiden spezifischen Extinktionskurven der Abb. 2 und 3. Die gute Übereinstimmung der Zahlenwerte mit den von SMITH und BENITEZ (l. c.) gefundenen wird durch Einzeichnung der spez. E-Kurven dieser Autoren am deutlichsten. Die Werte stellen das Mittel aus jeweils mehreren Bestimmungen dar. Um die Reproduzierbarkeit der Kurven zu prüfen, wurde folgendermaßen verfahren: Die Chlorophyllkonzentration einer Reihe von Proben wurde mit Hilfe der ermittelten Kurven bestimmt, hieraus der zu erwartende Mg-Gehalt errechnet und mit dem gefundenen verglichen. Die Abweichung der beiden Werte stellt ein Maß für die Genauigkeit der Kurven dar, die durch die Güte der Mg-Bestimmung gegeben ist. Tabelle 2 veranschaulicht einige Ergebnisse.

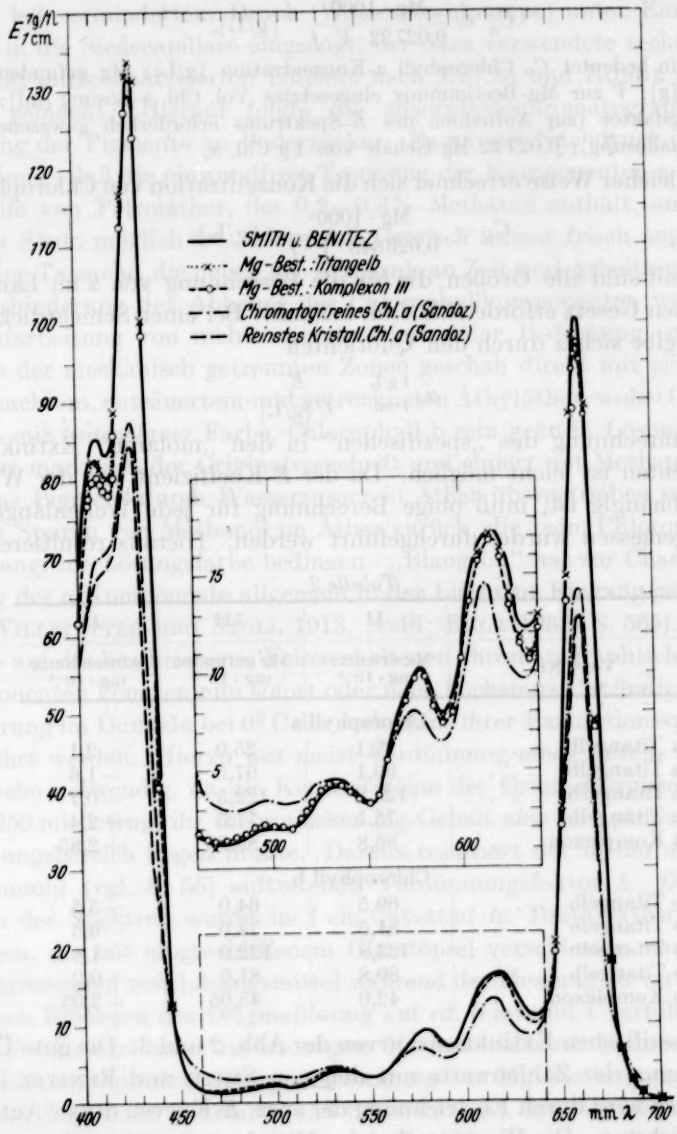


Abb. 2. Spezifische Extinktion von Chlorophyll a in Diäthyläther; Erläuterung s. Text

Die Spalte IV der Tabelle zeigt bei Chl. a, daß der Fehler innerhalb der Grenzen der Titangelb-Mg-Bestimmungen der Vorversuche liegt, für Chl. b gilt dies für Vers. Nr. 3b und 4b. Minusabweichungen sind durch Mg-Verluste während des Analysenganges durch Verspritzen oder unvollkommenes Überführen von einem ins andere Gefäß erklärbar. Am günstigsten liegt die Chlorophyllkonzentration, die Mg-Mengen zwischen 80 und 120 mg · 10^{-3} erwarten läßt.

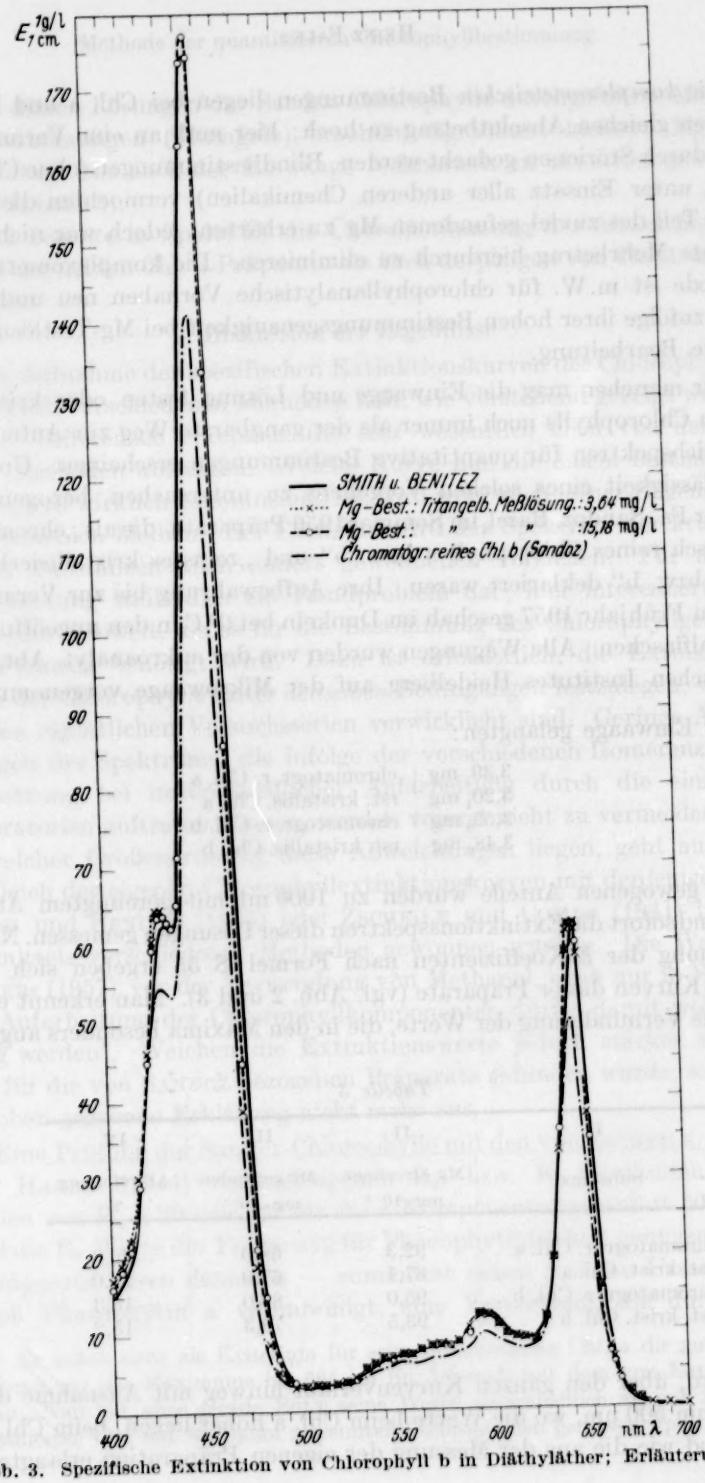


Abb. 3. Spezifische Extinktion von Chlorophyll b in Diäthyläther; Erläuterung s. Text

Die *komplexometrischen* Bestimmungen liegen bei Chl. a und b fast um den gleichen Absolutbetrag zu hoch; hier muß an eine Verunreinigung durch Störionen gedacht werden. Blindbestimmungen (ohne Chlorophyll, unter Einsatz aller anderen Chemikalien) vermochten dies für einen Teil des zuviel gefundenen Mg zu erhärten, jedoch war nicht der gesamte Mehrbetrag hierdurch zu eliminieren. Die komplexometrische Methode ist m.W. für chlorophyllanalytische Vorhaben neu und verdient zufolge ihrer hohen Bestimmungsgenauigkeit bei Mg-Testlösungen weitere Bearbeitung.

Für manchen mag die Einwaage und Lösung festen oder kristallisierten Chlorophylls noch immer als der gangbarste Weg zur Aufnahme von Eichspektren für quantitative Bestimmungen erscheinen. Um die Zuverlässigkeit eines solchen Vorgehens zu untersuchen, bezogen wir von der Fa. Sandoz, Basel, im Sommer 1956 Präparate, die als „chromatographisch reines Chlorophyll a bzw. b" und „reinstes kristallisierbares Chl. a bzw. b" deklariert waren. Ihre Aufbewahrung bis zur Verarbeitung im Frühjahr 1957 geschah im Dunkeln bei 0° C in den ungeöffneten Originalflaschen. Alle Wägungen wurden von der mikroanalyt. Abt. des Chemischen Institutes Heidelberg auf der Mikrowaage vorgenommen.

Zur Einwaage gelangten:

$3{,}39_1$ mg	chromatogr. r. Chl. a
$3{,}20_1$ mg	rst. kristallis. Chl. a
$3{,}53_9$ mg	chromatogr. r. Chl. b
$3{,}48_6$ mg	rst. kristallis. Chl. b

Die gewogenen Anteile wurden zu 1000 ml mit gereinigtem Äther gelöst und sofort die Extinktionsspektren dieser Lösungen gemessen. Nach Errechnung der *E*-Koeffizienten nach Formel S. 55 ergeben sich die spez. *E*-Kurven dieser Präparate (vgl. Abb. 2 und 3). Man erkennt eine deutliche Verminderung der Werte, die in den Maxima besonders augen-

Tabelle 3

I	II	III	IV
Substanz	Mg errechnet mg · 10^{-3}	Mg gefunden mg · 10^{-3}	Abweichung %
Chromatogr. r. Chl. a .	92,3	68,0	—26,3
Rst. krist. Chl. a . . .	87,1	67,0	—23,0
Chromatogr. r. Chl. b .	95,0	80,0	—15,3
Rst. krist. Chl. b . . .	93,5	79,3	—15,2

fällig wird, über den ganzen Kurvenverlauf hinweg mit Ausnahme der Bezirke um 500 nm, wo die Werte beim Chl. a höher liegen, beim Chl. b gleich sind wie die aus der Messung der eigenen Präparation erlangten.

Mit diesen Lösungen der Sandoz-Chlorophylle durchgeführte Magnesiumbestimmungen (Titangelb) brachten signifikant kleinere Mg-Gehalte zutage, als nach der Einwaage rechnerisch zu erwarten gewesen wäre (Tabelle 3).

Man beachte in Spalte IV die Übereinstimmung der Abweichungen sowohl der beiden Chl. a-Präparate als auch derjenigen von Chl. b untereinander.

Diskussion der Ergebnisse

Die Aufnahme der spezifischen Extinktionskurven der Chlorophylle a und b nach verschiedenen Methoden läßt, wie vorstehend gezeigt werden konnte, Differenzen erkennen, die sehr wesentlich eben von der Art dieser Methoden abhängen. Welche Kurve nun die einem bestimmten Chlorophyll wirklich zukommende ist, wird wohl auch ferner Gegenstand der Diskussion bleiben. Der Chemiker wird das Spektrum der kristallisierten Substanzen allen anders gewonnenen vorziehen. Für unsere Untersuchung stellt dies ein Randproblem dar; hier interessiert dies Spektrum insoweit, als es für die Bestimmung des Chlorophyllgehaltes von Pflanzen benötigt wird. Dazu ist erforderlich, die Extinktionskurve der Chlorophylle unter *denselben* Bedingungen festzulegen, wie sie bei den eigentlichen Versuchsserien verwirklicht sind. Geringe Abweichungen des Spektrums, die infolge der verschiedenen Isomerenzusammensetzung bei unterschiedlicher Aufarbeitung durch die einzelnen Laboratorien auftreten können, werden vorerst nicht zu vermeiden sein. In welcher Größenordnung diese Abweichungen liegen, geht aus dem Vergleich der eigenen Chlorophyllextinktionskurven mit denjenigen von Smith und Benitez (1955) oder Zscheile und Comar (1941) hervor, die mittels verschiedener Methoden gewonnen wurden. Die Warnung Hagers (1957) vor der Verwendung von Methanol, auch nur in Spuren, zur Aufarbeitung der Chlorophyllkomponenten dürfte damit wohl hinfällig werden[1]. Weichen die Extinktionswerte jedoch stärker ab, wie dies für die von Sandoz bezogenen Präparate gefunden wurde, so reicht die oben gegebene Erklärung nicht mehr aus.

Eine Prüfung der Sandoz-Chlorophylle mit den von Zscheile, Comar und Harris (1944) vorgeschlagenen R_a- bzw. R_b-Quotienten ergibt Zahlen von $R_a = 20$ bzw. 22 für die a-Komponente (gefordert 50), während die R_b-Werte der Forderung für Phaeophytinfreiheit genügen. Beide a-Präparate wären demnach — zumindest neben anderen Ursachen — durch Phaeophytin a verunreinigt, eine Vermutung, die durch den

[1] Er selbst zieht als Kriterium für sein unverändertes Chl. a die gute Übereinstimmung des Maximums bei 665 nm (in Äthanol) mit dem von Egle (1939) heran. Nun hat aber gerade Egle seine Werte ausschließlich an mit Methanol extrahierten und mit Methanol getrennten Chlorophyllen gemessen (pers. Mitt. v. Prof. Seybold).

analytisch zu geringen Mg-Gehalt eine Stütze findet. Die b-Präparate lassen keine Deutung zu. Auffallend ist, daß beide a angenähert, beide b den gleichen Mg-Verlust aufweisen. Die Frage, ob dies ein Effekt der Aufbewahrung ist, muß hierbei allerdings offenbleiben[1]. Dazu erwähnt sei jedoch, daß STOLL und WIEDEMANN (1955) eben diese Präparate „sowohl in Substanz, als auch in Lösung auffallend stabil" nennen, und SMITH und BENITEZ (1955), die die Präparationstechnik nach STOLL und WIEDEMANN (1952) referieren, sie als „stable for years if stored in the dark out of contact with air" bezeichnen. In diesem Zusammenhange muß daran erinnert werden, daß ZSCHEILE und COMAR (1941) gleichfalls derartige Präparate vorlagen, und etwa die gleichen Abweichungen gemessen wurden, wie sie in der vorliegenden Arbeit auftraten. ZSCHEILE, COMAR und HARRIS (1944) kommen zu dem Ergebnis, daß „no commercial sample of solid chlorophyll examined in these laboratories had absorption coefficients approaching those of good undried samples prepared here". Es zeigt sich also, daß Chlorophyllpräparationen *in Lösung* für Eichzwecke unbedingt der Vorzug gegenüber festen Präparaten zu geben ist.

Wenn SEYBOLD u. Mitarb. gleichfalls feste Präparate zur Eichung ihres Pulfrich-Photometers benutzten, so entsprach dies den seinerzeitigen analytischen Möglichkeiten. Ein Vergleich der nun mit der bei uns üblichen Aufarbeitung der Chlorophyll-Lösungen, jedoch gegenüber damals anderer Konzentrationsbestimmung durchgeführten Neuaufnahme der quantitativen Extinktionsspektren, ergibt Abweichungen, die denjenigen der käuflichen Präparate sehr ähnlich sind. Errechnet man unter Zuhilfenahme dieser Kurven die Korrektionsfaktoren für die von SEYBOLD u. Mitarb. (1937—1956) veröffentlichten quantitativen Angaben, so ergibt sich für Chlorophyll a 0,67, für Chlorophyll b 0,84. Einige Analysen, die Herr Dr. BAUER (1957, unveröffentl.) am Heidelberger Institut vergleichsweise an noch zugänglichen Objekten der damaligen Messungen durchgeführt hat, bestätigen im Rahmen der Streuungsbreite dieser Objekte obige Korrektionsfaktoren. Dabei ergab sich, daß für die von SEYBOLD aus der damals gefundenen Pigmentausstattung der verschiedenen Untersuchungsobjekte getroffenen prinzipiellen Schlußfolgerungen die Korrektur keine grundsätzliche Änderung einbringt. Die Klärung spezieller Einzelfragen jedoch wird erst durch die genaue Bestimmung der spez. Extinktionskurven ermöglicht, und gleichzeitig die Voraussetzung zur quantitativen Analyse der Blattpigmente in Lösung ohne vorherige Trennung geschaffen. Geringe Schwankungen des Chlorophyllgehaltes z. B. können damit unter erhöhter Sicherheit festgestellt werden, da auch die Fehlerbreite eingeengt werden konnte.

[1] Leider sind uns nur die molaren Extinktionsspektren der frischen Präparate in Dioxan bekannt geworden (briefl. Mitt. v. E. WIEDEMANN), so daß ein Vergleich dieser mit den in Äther gemessenen nicht möglich war.

Zur quantitativen Chlorophyllbestimmung auf optischem Wege empfiehlt sich unter den heute gegebenen experimentellen Möglichkeiten also, wie gezeigt werden konnte, die Präparation der chromatographisch reinen Komponenten *in Lösung*. Die Konzentrationsbestimmung mit Hilfe der quantitativen Magnesium-Mikroanalyse bietet zwar arbeitstechnisch größere Schwierigkeiten; sie liefert aber für die Vorhaben des Pflanzenphysiologen zuverlässigere Werte.

Wir sind übrigens gerne bereit, für andere Laboratorien die Eichung von Spektralphotometern und Colorimetern zur quantitativen Chlorophyllbestimmung durchzuführen.

Zusammenfassung

Die am Botanischen Institut in Heidelberg seither gebräuchliche Methode für quantitative Chlorophyllbestimmungen wird überprüft. Hierzu ist die Aufnahme der spezifischen Extinktionsspektren der Komponenten a und b in ätherischer Lösung erforderlich. Die für die Berechnung der spez. Extinktionskoeffizienten benötigte Kenntnis der Lösungskonzentration kann auf zweierlei Weise erlangt werden:

a) mit Hilfe von Magnesium-Mikrobestimmungen chromatographisch gereinigter Chlorophylle nach colorimetrischen und komplexometrischen Verfahren. Dabei liegen die Pigmente an keiner Stelle des Arbeitsganges in festem Zustand vor, die Aufarbeitung erfolgt unter denselben Bedingungen wie bei Serienbestimmungen.

b) durch Einwaage von käuflichen Chlorophyllkristallisaten.

Der Vergleich der mittels a) und b) gefundenen Kurven ergibt Unterschiede, deren Ursache diskutiert wird. Für die quantitative Bestimmung der Chlorophylle ist die nach a) ermittelte spez. Extinktionskurve vorzuziehen. Sie stimmt mit der von Smith und Benitez (1955) veröffentlichten überein.

Die quantitativen Angaben von Seybold u. Mitarb. (1937—1956) bedürfen einer Korrektur, deren Ausmaß jedoch nichts Grundsätzliches an den gewonnenen Erkenntnissen ändert.

Herrn Prof. Dr. A. Seybold gebührt mein ganz besonderer Dank für die Anregung zu vorliegender Untersuchung und viele, den Fortgang der Arbeit fördernde Diskussionen. Auch der Deutschen Forschungsgemeinschaft sei für eine Reihe zur Verfügung gestellter Geräte und Chemikalien, den Assistenten von Herrn Prof. Dr. Nast (Chem. Inst. Heidelbg.) für manchen methodisch wertvollen Rat gedankt.

Literatur

Bussmann, A.: Die Magnesiumbestimmung mit Titangelb. Angew. Chem. **148**, 413 (1956). — Egle, K.: Untersuchungen über das Chlorophyll. Sitzgsber. Heidelberg. Akad. Wiss., Math.-naturwiss. Kl. **1939**, Nr 1, 19. — Die Farbstoffe. In W. Ruhlands Handbuch der Pflanzenphysiologie, Bd. I. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1955. — Glemser, O., and W. Dautzenberg: Zur colorimetrischen Bestimmung des Magnesiums mit Titangelb. Analyt. Chem. **136**, 254 (1952). —

Granick, S.: Magnesium vinyl pheoporphyrin a_5, another intermediate in the biological synthesis of chlorophyll. J. of Biol. Chem. **183**, 713 (1950). — Hager, A.: Zur Chromatographie der lipoidlöslichen Blattfarbstoffe. Planta (Berl.) **48**, 592 (1957). — Lange, B.: Kolorimetrische Analyse, 5. Aufl. Weinheim 1956. — Ludwig, E. E., and C. R. Johnson: Spectrophotometric determination of magnesium by titan yellow. Ind. Engng. Chem., Analyt. Edit. **14**, 895 (1942). — Meyer, F. R., u. G. Ronge: Entfernung von Sauerstoff aus Gasen mittels aktiven Kupfers. Z. angew. Chem. **52**, 637 (1939). — Schwarzenbach, G., u. W. Biedermann: Chimia **2**, 56 (1948). Zit. nach G. Schwarzenbach u. H. Flaschka, Komplexone. Zofingen (Schweiz) o. J. — Seybold, A., u. K. Egle: Lichtfeld und Blattfarbstoffe. I. Planta (Berl.) **26**, 491 (1937). — II. Planta (Berl.) **28**, 87 (1938). — Zur chromatographischen Methode der Blattpigmente. Planta (Berl.) **29**, 114 (1939). — Smith, J. H. C., u. A. Benitez: Chlorophylls, Analysis in plant materials. In K. Paech u. M. V. Tracey, Moderne Methoden der Pflanzenanalyse, Bd. IV. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1955. — Spohn, H.: Eine einfache Methode zur Trennung der Blattfarbstoffe. Planta (Berl.) **23**, 657 (1935). — Stoll, A., u. E. Wiedemann: Über die kristallisierten natürlichen Chlorophylle a und b. Angew. Chem. **67**, 716 (1955). — Weigert, F.: Optische Methoden der Chemie. Leipzig 1927. — Willstätter, R., u. A. Stoll: Untersuchungen über Chlorophyll. Berlin 1913. — Zscheile, F. P., and C. L. Comar: Influence of preparative procedure on the purity of chlorophyll components as shown by absorption spectra. Bot. Gaz. **102**, 463 (1941). — Zscheile, F. P., C. L. Comar and D. G. Harris: Spectroscopic stability of chlorophylls a and b and certain analytical considerations. Plant Physiol. **19**, 627 (1944).

Dr. H. Falk,
Heidelberg, Botanisches Institut der Universität

Planta, Bd. 51, S. 63—69 (1958)

Aus dem Biologischen Institut der Tschechoslowakischen Akademie der Wissenschaften

EINE NEUE ANWENDUNG DER CO_2-BESTIMMUNG NACH KAUKO ZU ASSIMILATIONSMESSUNGEN

Von

JIŘÍ ČATSKÝ und BOHDAN SLAVÍK

Mit 3 Textabbildungen

(Eingegangen am 4. November 1957)

Einleitung

Der Mangel an einfachen und dabei genügend präzisen Methoden für die Bestimmung der Assimilationsintensität bei physiologischen und ökologischen Studien im Freien ist immer noch ein ernstes Problem der Pflanzenökologen. Die bisher genauesten und physiologisch am besten begründeten Methoden (z. B. URAS-Analyse), erfordern ein elektrisches Netz und kostspielige, umfangreiche Einrichtungen, welche im Freiland kaum verwendbar sind. Die sog. „Feldmethoden" zur Bestimmung der Assimilationsintensität dagegen weisen bisher noch eine Reihe von Fehlern auf, welche zu häufigen Kritiken und Diskussionen über die Glaubwürdigkeit der erlangten Ergebnisse geführt haben. Zu diesen Methoden gehört auch die von ÅLVIK (1939) beschriebene Assimilationsbestimmung, deren Prinzip (KAUKO 1934, 1935) die Möglichkeit weiterer Verbesserungen bietet.

In ihrer ursprünglichen Form weist die Methode KAUKOs der CO_2-Assimilationsbestimmung (ÅLVIK 1939, ZELLER 1951, LANGE 1953, 1956 u. a.), wie begreiflich, jene Hauptmängel auf, die sich wie bei allen ähnlichen Methoden aus dem Wunsch nach möglichster Vereinfachung ergeben: Absinken der CO_2-Konzentration in der Luft während des Versuches und rasches Entstehen des sog. Cuvettenmikroklimas. Zu diesen allgemeinen Mängeln kommt noch hinzu die verhältnismäßig langsame Einstellung des Gleichgewichts zwischen dem CO_2-Gehalt der Luft und dem p_H-Wert der Natriumbicarbonatlösung (KAUKO 1934, 1935, FRENZEL 1955, LANGE 1956). Deshalb ist diese Anordnung nur für solche Versuche geeignet, bei welchen sich die angeführten Mängel nur in geringem Maße bemerkbar machen (lange Exposition bei niedriger Assimilationsintensität, diffuses Licht, niedrige Temperatur). Zu anderen ökologischen Messungen, wie z. B. die kurzfristige Bestimmung der Assimilation einzelner Blätter mit hoher Assimilationsintensität, kann diese Meßmethode nicht verwendet werden. In der vorliegenden Arbeit haben wir uns bemüht, die Vorteile der Bestimmung der Assimilation in ständig frischem Luftstrome mit der Einfachheit des Ålvikschen Verfahrens zu verbinden.

Ein Vorschlag für einige Modifikationen des Verfahrens und ihre Bewertung

Die Beseitigung resp. eine Verringerung der vorerwähnten Mängel ist begreiflicherweise schwierig, wenn die Methode dabei nicht ihre wertvolle Einfachheit einbüßen soll. Die von uns vorgeschlagenen Einrichtungen und Verfahren sind so gewählt, daß sie ökologische Serienmessungen im Freien unter möglichst natürlichen Bedingungen ermöglichen.

1. Erste Modifikation. Der Einfluß der ersten beiden schädlichen Faktoren, des Überhitzens der Blätter und des langsamen Einsetzens

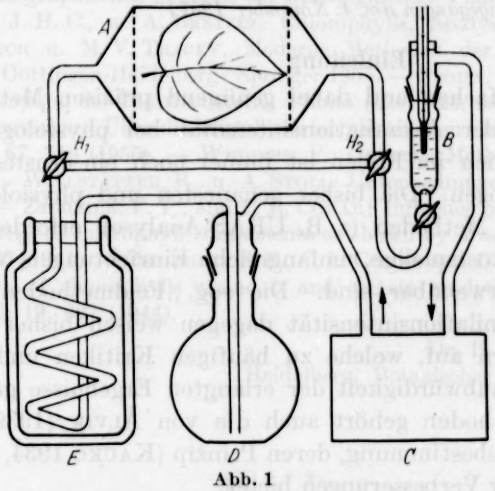


Abb. 1

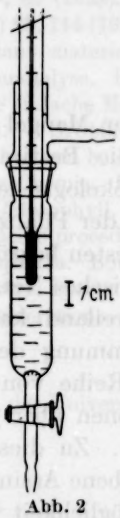


Abb. 2

Abb. 1. Schema der Einrichtung mit geschlossenem Luftstromkreis. *A* Assimilationskammer mit Blatt; *B* Durchperlungseinrichtung (s. auch Abb. 2); *C* Membranpumpe für Akkumulatorenbetrieb; *D* auswechselbares Schliffgefäß zur Erhöhung des Gesamtvolumens der Luft bei höherer Assimilationsintensität; *E* Kühlvorrichtung (kann bei manchen Versuchen entbehrt werden); H_1 und H_2 Dreiwegehähne zur Ausschaltung der Assimilationskammer aus dem Luftkreis nach der Exposition (s. Text). (Alle Bestandteile außer der Cuvette kann man in einen leicht tragbaren Koffer einbauen)

Abb. 2. Durchperlungseinrichtung

des Gleichgewichtes zwischen Luft und Natriumbicarbonatlösung, kann dadurch verringert bzw. beseitigt werden, daß man Luft durch die Assimilationskammer und dann durch ein mit Natriumbicarbonatlösung gefülltes Durchperlungsgefäß strömen läßt; so ensteht der Ausgleich in verhältnismäßig kurzer Zeit (SAJANIEMI 1936, KALLE 1937, LANGE 1956). In Abb. 1 ist eine der Möglichkeiten dargestellt, welche das langsame Einsetzen des Gleichgewichtes beseitigt und zum Teil auch ein Überhitzen der assimilierenden Blätter verhütet. Diese Modifikation kann vorteilhaft bei mittlerer und niedriger Assimilationsintensität verwendet werden. Die Luft läßt man während der Exposition mittels einer Membranpumpe in einem geschlossenen Luftstromkreis zirkulieren, in welchem die Assimilationskammer, eine Einrichtung

zum Durchperlen der Luft (Abb. 2), ein Gefäß zur Erhöhung des Luftvolumens und gegebenenfalls eine Kühlvorrichtung eingeschaltet sind. Nach der Exposition wird die Assimilationskammer durch zwei Dreiwegehähne ausgeschaltet und die Luft des Systems so lange durch die Natriumbicarbonatlösung weitergeperlt, bis der p_H-Endwert erreicht ist.

2. Zweite Modifikation. Ein weiterer Mangel, die sinkende CO_2-Konzentration, kann allerdings nur durch eine wesentliche Veränderung des ganzen Vorganges beseitigt werden, da die ursprüngliche Me-

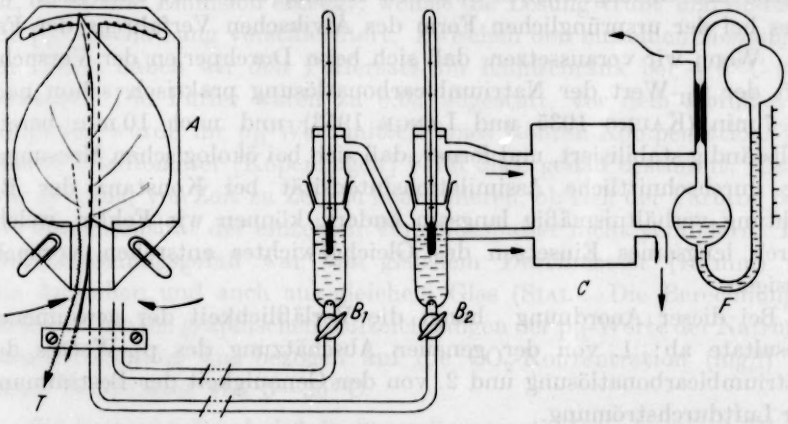


Abb. 3. Schema der Durchströmungseinrichtung. *A* Kammer aus Polyäthylen mit Blatt (*T* Thermoelement); B_1 und B_2 Durchperlungseinrichtung (s. auch Abb. 2); *C* Doppelmembranpumpe für Akkumulatorenbetrieb; *F* Capillar-Strömungsmesser. Die Durchperlungsgefäße und die Membranpumpe mit dem Strömungsmesser können vorteilhaft in einem tragbaren Koffer untergebracht werden, aus welchem bloß einige Meter lange Gummischläuche zur Assimilationskammer führen

thode gerade diese Senkung zur Bestimmung der Assimilationsintensität ausnützt. Bei höherer Intensität der Photosynthese (etwa von 0,5 mg/dm² · h an) können wir das gleiche Prinzip verwenden, auf welchem die modernen, sehr genauen Bestimmungsmethoden der Assimilationsintensität beruhen, d. h. die Messung des CO_2-Gehaltes in der Luft vor und nach Durchströmung der Assimilationskammer. Bei dieser Arbeitsweise (Abb. 3) wird der CO_2-Mangel während des Versuches sowie das Überhitzen des Blattes, auf ein erträgliches Maß herabgesetzt, indem ständig frische Luft durch die Assimilationskammer gesaugt wurde. Die Strömungsgeschwindigkeit der Luft sowie die Größe des assimilierenden Blattes müssen bei diesem Vorgang begreiflicherweise so gewählt werden, daß der Unterschied zwischen dem CO_2-Gehalt der Kontrolluft und der verbrauchten Luft nicht höher wird als 25—30% und daß kein akuter CO_2-Mangel in der Kammer entsteht.

Als Assimilationskammer verwendeten wir eine Kammer aus Polyäthylenfolie (Abb. 3) — ähnlich der Cellophankammer HEINICKES —,

welche durch ihre Einfachheit und leichte Handhabung für Arbeiten im Freien besonders geeignet ist. Sie gestattet ein besonders einfaches Arbeiten mit unbeschädigten Blättern an der Pflanze, da es nicht nötig ist, die Kammer abzudichten. Für einige Versuche wäre es auch möglich, die sog. Ansaugplatte (KOCH 1956) zu verwenden. Die Luft läßt man nach dem Verlassen der Assimilationskammer durch eine Lösung von 0,001 n $NaHCO_3$ + 0,099 n KCl im Gefäß B perlen. Dadurch werden jene Fehler herabgesetzt oder beseitigt, welche durch langsames Einsetzen des Gleichgewichtes zwischen Lösung und Luft entstehen, wie dies bei der ursprünglichen Form des Ålvikschen Verfahrens der Fall ist. Wenn wir voraussetzen, daß sich beim Durchperlen der Versuchsluft der p_H-Wert der Natriumbicarbonatlösung praktisch schon nach 4—7 min (KAUKO 1935 und LANGE 1953) und nach 10 min bereits vollständig stabilisiert, und ferner, daß sich bei ökologischen Messungen die durchschnittliche Assimilationsintensität bei Konstanz der Belichtung verhältnismäßig langsam ändert, können wir Fehler, welche durch langsames Einsetzen des Gleichgewichtes entstehen, vernachlässigen.

Bei dieser Anordnung hängt die Verläßlichkeit der gewonnenen Resultate ab: 1. von der genauen Abschätzung des p_H-Wertes der Natriumbicarbonatlösung und 2. von der Genauigkeit der Bestimmung der Luftdurchströmung.

1. Was den ersten Punkt betrifft, bedeutet ein fehlerhaftes Ablesen um 0,01 p_H einen Fehler in der Bestimmung der CO_2-Konzentration in der Luft um 2,3% (KAUKO 1934, 1935). Daher ist es bei colorimetrischer p_H-Bestimmung unerläßlich, daß das Durchströmungsgefäß und die Ampullen mit den Vergleichspufferlösungen die gleiche Dimension und Wandstärke besitzen und aus demselben Glas hergestellt sind. Auch die Mengen der Natriumbicarbonatlösung mit Indicator und der Vergleichspufferlösungen sollen gleich sein. Für einige Assimilationsmessungen ist es unvorteilhaft, Kresolrot als p_H-Indicator zu verwenden. Kresolrot hat nämlich seinen gut sichtbaren Umschlagsbereich zwischen 7,5—8,2 p_H. Höhere p_H-Werte, zu welchen wir regelmäßig gelangen, können wir nur sehr ungenau feststellen. Daher ist es für Assimilationsmessungen vorteilhafter, einen solchen Indicator zu wählen, welcher eine genügend genaue Schätzung bis zu 8,6—8,7 p_H gewährleistet. In unseren Versuchen verwendeten wir je nach dem zu messenden p_H-Bereich ein Gemisch von Kresolrot und Thymolblau, eventuell mit Zusatz von Bromthymolblau. Lösungen mit Zusatz von Phenolphthalein, dessen Umschlagsbereich an sich sehr günstig läge, sind leider unbeständig. Für Respirationsmessungen und Bilanzversuche des Gasaustausches kann man vorteilhafterweise wohl auch reines Kresolrot verwenden. Für genügend genaue Schätzungen des p_H-Wertes

läßt sich begreiflicherweise nur jener Umschlagsbereich verwenden, in welchem die Farbunterschiede sehr markant sind. Mit den genannten Indicatoren kann man bei hinreichender Erfahrung den p_H-Wert mit einer Genauigkeit von $\pm 0{,}02$ p_H bestimmen.

Die Vergleichspuffer (Borax-Borsäure) haben wir unter Beimengung eines Indicators in Ampullen von 10 ml eingeschmolzen. Zwecks Sterilisation wurde ein Körnchen Thymol beigegeben. Zu demselben Zwecke kann man auch Toluen verwenden, welches aber weniger vorteilhaft ist, da es eine Emulsion erzeugt, welche die Lösung trübt und dadurch die p_H-Abschätzung verschlechtert. Zwischen den einzelnen Messungen im Freien haben wir den Puffersatz im Kühlschrank bei $+4^0$ C aufbewahrt. Die Puffer waren zu 0,03 abgestuft, vor dem Abfüllen in Ampullen wurde ihr p_H-Wert mittels eines Röhren-Kompensations-p_H-Meters (Radiometer [Kopenhagen] PHM 3ik), genau bestimmt. Dabei war es nötig, von Zeit zu Zeit zu kontrollieren, ob sich der Farbton oder die Farbintensität der einzelnen Vergleichspuffer nicht verändern. Das Durchströmungsgefäß war von gleichem Durchmesser (15 mm) wie die Ampullen und auch aus gleichem Glas (SIAL). Die Berechnungen stellten wir nach graphischen Aufzeichnungen der p_H-Werte der Natriumbicarbonatlösung an, bezogen auf die CO_2-Konzentration (mg/l) bei einer Temperatur von 5—35° C.

Mit Rücksicht darauf, daß die Stammlösungen der Indicatoren mit Äthanol bereitet sind, dessen Dämpfe die Assimilation bei der Versuchsanordnung I beeinflussen könnten, da diese ja mit einem geschlossenen Luftstromkreis arbeitet, war die folgende Herstellungsweise der Natriumbicarbonatlösung vorzuziehen: dem Wasser, welches zur Bereitung der Lösung des $NaHCO_3 + KCl$ bestimmt war, setzten wir zuerst die benötigte Menge Indicator zu. Durch minutenlanges Erwärmen auf etwa 90° C wurde dann das Äthanol verdampft, worauf wir nach Abkühlen in dieser alkoholfreien Indicatorlösung die eingewogene Menge $NaHCO_3$ p. a. und KCl p. a. lösten und auf das nötige Volumen auffüllten. Diese Vorsichtsmaßnahme ist bei der Versuchsanordnung II begreiflicherweise nicht nötig.

2. Ungenaues Einstellen der Luftströmung beeinträchtigt bei der Versuchsanordnung II begreiflicherweise die ganze Bestimmung. Der Luftstrom kann im Gelände entweder eudiometrisch aus dem Luftvolumen bestimmt werden, welches während eines bestimmten Zeitraumes durch die Assimilationskammer und das Durchperlungsgefäß gesaugt wird (das Eudiometer kann dabei an das Ende der Luftleitung hinter die Pumpe montiert werden), oder man ermittelt ihn mittels des eingeschalteten Capillar-Strömungsmesser (Abb. 3). Der Capillar-Strömungsmesser, welcher sehr leicht eudiometrisch geeicht werden kann, garantiert bei Strömungen von 100—250 ml/min eine 5%ige Genauigkeit der Ablesung. Zur Begutachtung der Genauigkeit der Resultate möge folgendes Beispiel dienen [aus den Messungen der Assimilationsintensität bei Tabak (*Nicotiana affinis*)]:

Kontrolluft: p_H bei 25° C: 8,06 ± 0,02, entspricht 0,793 ± 0,036 mg CO_2/1000 ml Luft; möglicher Fehler demnach ± cca 5%. *Durch die Pflanze veränderte Luft:* p_H bei 26° C: 8,21 ± 0,02, entspricht 0,580 ± 0,028 mg CO_2/1000 ml Luft, möglicher Fehler also ± cca 5%.

Aus der Kombination der Fehler bei der einen oder anderer p_H-Bestimmung ergibt sich ein durchschnittlicher Fehler der Assimilationsbestimmung von ± 5%, maximal von ± 10%. Zu diesem Fehler kommt noch der Fehler bei der Bestimmung der Luftströmung hinzu, welcher allerdings bei richtiger Ausführung ± 5% nicht übersteigt.

Die beschriebene Durchströmungsmethode (Versuchsanordnung II) ermöglicht fortlaufende Bestimmungen der CO_2-Assimilationsintensität, da die Lösung, durch die wir die Luft durchperlen lassen, selbst bei längeren Versuchen ihre Eigenschaften nicht ändert (außer einer gewissen Konzentrationssteigerung infolge Verdampfung des Wassers beim Durchperlen). Es ist allerdings vorteilhaft, wenn man die Lösung (ebenso wie die Vergleichspuffer) vor ständigem direkten Sonnenlicht schützt. Die Differenz zwischen Versuchs- und Kontrolluft soll durch das Regulieren der Luftstromgeschwindigkeit auf einer optimalen Höhe gehalten werden, welche die Möglichkeit einer genügend genauen colorimetrischen Bestimmung der CO_2-Abnahme gewährleistet. Mit der gleichen Einrichtung kann man besonders vorteilhaft auch die CO_2-Konzentration als ökologischen Faktor bei allen Geländemessungen der Pflanzen- und Tierökologie sowie der Bioklimatologie bestimmen; aber auch im Laboratorium dürfte sich die Methode zur Kontrolle des CO_2-Faktors eignen, der bei physiologischen Versuchen meist nicht genügend berücksichtigt wird.

Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit sind zwei Modifikationen der CO_2-Bestimmung nach KAUKO zur Messung der Assimilationsintensität beschrieben, welche die Hauptunzulänglichkeit der Ålvikschen Methode, das allzu langsame Einspielen des Gleichgewichtes zwischen Luft und Natriumbicarbonatlösung, beseitigen. Durch die Verwendung von zwei Indicatoren für verschiedene p_H-Bereiche wird eine genauere colorimetrische p_H-Schätzung möglich, welche ja bei dieser Methode der limitierende Faktor der Genauigkeit ist. Bei beiden Anordnungen läßt man die zu analysierende Luft durch die Natriumbicarbonatlösung durchperlen. Die erstere Modifikation verwendet einen geschlossenen Luftstromkreis zwischen der Cuvette mit dem exponierten Blatt und dem Durchperlungsgefäß (s. Abb. 1), wodurch auch der störende Einfluß des Mikroklimas in der Cuvette verringert wird. Die zweite Modifikation, welche für viele ökologische Messungen vorteilhafter ist, bewahrt die Vorteile der Assimilationsmessung unter ständig strömendem Luftstrom: Kontinuität der Bestimmungen, Regulierbarkeit des Mikro-

klimas in der Cuvette, Einfachheit der Kammer und ihre leichte Aufsetzbarkeit auf das Blatt resp. den Zweig. Dazu gewährleistet sie auch noch die Vorteile des Ålvikschen Verfahrens: unmittelbare Ablesbarkeit der Resultate während des Versuches, einfacher, für das Gelände vorteilhafter Aufbau. Die beschriebene Einrichtung eignet sich auch zur Bestimmung und zur einfachen Kontrolle des CO_2-Faktors bei vielen Gelände- und Laboratoriumsarbeiten.

Literatur

ÅLVIK, G.: Über Assimilation und Atmung einiger Holzgewächse im westnorwegischen Winter. Meddel. Nr 22 fra Vestlandets Forstlige Forsøksstation **6**, 1—266 (1939). — FRENZEL, B.: Einige Bemerkungen zu der CO_2-Bestimmungsmethode nach ÅLVIK. Planta (Berl.) **46**, 447—466 (1955). — KALLE, K.: Eine einfache Schnellmethode zur Bestimmung der Luftkohlensäure nach Y. KAUKO. Ann. Hydrogr. u. marit. Meteorol. **65**, 212—214 (1937). — KAUKO, Y.: Zur Bestimmung der Kohlensäure in der Luft mit Hilfe von p_H-Messungen. Angew. Chem. **47**, 164—167 (1934). — Ein Apparat zur potentiometrischen Bestimmung der Luftkohlensäure. Angew. Chem. **48**, 539—540 (1935). — KOCH, W.: Eine neue Methode zur Lösung des Küvettenproblems bei der Registrierung des Gaswechsels. Naturwiss. **43**, 64 (1956). — LANGE, O. L.: Hitze- und Trockenresistenz der Flechten in Beziehung zu ihrer Verbreitung. Flora (Jena) **140**, 39—97 (1953). Zur Methodik der kolorimetrischen CO_2-Bestimmung nach ÅLVIK. Ber. Dtsch. bot. Ges. **69**, 49—60 (1956). — SAJANIEMI, I. K.: Ilman hiilihapan määrääminen. (Zur Bestimmung der Kohlensäure in der Luft). Acta forest. fenn. **42**, 1—11 (1936). — ZELLER, O.: Über die Assimilation und Atmung der Pflanzen im Winter bei tiefen Temperaturen. Planta (Berl.) **39**, 500—526 (1951).

Prom. Biol. J. ČATSKÝ und Dr. B. SLAVÍK,
Biologisches Institut der Tschechoslowakischen Akademie der Wissenschaften,
Praha XIX., Na cvičišti 2, ČSR.

Planta, Bd. 51, S. 70—73 (1958)

Aus dem Max-Planck-Institut für Biologie, Abt. MELCHERS, Tübingen

DER EINFLUSS VON GIBBERELLIN AUF DAS WACHSTUM VON GEWEBEKULTUREN DES CALLUS VON DAUCUS CAROTA

Von

L. BERGMANN

Mit 1 Textabbildung

(Eingegangen am 7. November 1957)

Wie SACHS und LANG 1957 gezeigt haben, ruft Gibberellin (s. Sammelreferat von STOVE und YAMAKI 1957) beim Auslösen des Sproßwachstums von unvernalisierten, zweijährigen Pflanzen von *Hyoscyamus niger* einen 10fachen Anstieg der Zellteilungsrate hervor. Diese Wirkung des Gibberellins auf die Zellteilung veranlaßte uns, seinen Einfluß auf das Wachstum von Gewebekulturen zu untersuchen.

Für unsere Versuche verwandten wir Callusgewebe von *Daucus carota*[1], das seit mehr als 2 Jahren in unserem Laboratorium auf folgendem Medium kultiviert wird: Mineralsalze und Vitaminzusätze nach WHITE 1954, 2% Saccharose, 7% Cocosmilchabkochung, 10^{-5} g/ml β-Indolylessigsäure (IES) und 0,8% Agar. Zu diesem Medium wurde nach der Sterilisation im strömenden Dampf und Abkühlen auf 40° C eine steril filtrierte Lösung der Gibberellinsäure (GS)[2] gegeben. Vor der Filtration wurde die GS mit n/10 NaOH auf ein p_H von 7,0 eingestellt, so daß keine Verschiebung des p_H-Wertes der Nährlösung erfolgte.

Zur Kultur dienten Schrägagarröhrchen mit 6 ml Agar, die mit Gewebestücken von etwa 60 mg Frischgewicht beimpft wurden. Die Kultur erfolgte im Dunkeln bei 24° C. Nach 49 Tagen wurde von jeder Kultur eine Subkultur mit etwa gleicher Ausgangsmenge angelegt und anschließend das Frisch- und Trockengewicht der einzelnen Kulturen bestimmt. Jede Versuchsserie enthielt 20 Parallelkulturen. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte von je 20 Kulturen. Die statistische Prüfung der Ergebnisse erfolgte nach PÄTAU 1943.

Ergebnisse

Wie aus der Tabelle 1 und der graphischen Darstellung Abb. 1 hervorgeht, wird das Wachstum der Gewebe unter den vorliegenden Bedingungen durch GS in Gegenwart von IES nicht gefördert, sondern gehemmt. Die Hemmung beträgt im Mittel 25% des Wachstums der Kontrollen und bleibt über drei Passagen, d. h. während einer Kulturdauer von 150 Tagen konstant. Die Differenzen zu den Normalkulturen sind dabei mit einem $P = 0{,}0002$ in allen Fällen gut gesichert. Die Wachstumsdifferenzen zwischen den einzelnen Kulturserien in den aufeinanderfolgenden Passagen liegen völlig im Bereich der normalen Streuung des Versuchsmaterials.

[1] Die Kulturen sind von E. BÜNNING und R. KAUTT 1954 isoliert und uns freundlicherweise überlassen worden (s. auch MELCHERS und ENGELMANN 1955).

[2] Gibberellic acid der Lilly Research Laboratories, Charge 316—62 AD—249, 11—29—56. Wir möchten auch an dieser Stelle der Firma und ihrem Mitarbeiter Herrn Dr. LEBEN für die großzügige Unterstützung danken.

Tabelle 1. *Statistische Beurteilung des Vergleichs des Wachstums von Geweben von Daucus carota in Abhängigkeit von Gibberellinsäure und β-Indolylessigsäure*

	− GS	$5 \cdot 10^{-5}$ GS	10^{-4} GS	Δ (− GS − $5 \cdot 10^{-5}$ GS)		Δ (− GS − 10^{-4} GS)	
				Δ	P	Δ	P
1. Passage. Zuwachs der Gewebe nach 49 Tagen in Milligramm							
10^{-5} IES	33,14 ± 3,6	24,1 ± 3,9	24,6 ± 4,2	−9,04 ± 1,5	0,0002	−8,54 ± 1,6	0,0002
−IES	27,27 ± 7,3	17,5 ± 6,9	15,5 ± 6,9	−9,87 ± 2,3	0,0002	−11,87 ± 2,3	0,0002
Δ	−5,87 ± 2,08	−6,6 ± 1,76	−9,1 ± 1,87				
P	0,01	0,0006	0,0002				
2. Passage. Zuwachs der Gewebe nach 49 Tagen in Milligramm							
10^{-5} IES	30,5 ± 5,3	24,6 ± 7,2	22,1 ± 5,2	−5,9 ± 2,0	0,005	−8,4 ± 1,65	0,0002
− IES	20,5 ± 9,0	29,6 ± 6,7	23,8 ± 6,3	+9,01 ± 2,5	0,001	+3,3 ± 2,6	0,2
Δ	−10,0 ± 2,4	+5,0 ± 2,2	−1,7 ± 1,84				
P	0,0002	0,02	—				
3. Passage. Zuwachs der Gewebe nach 48 Tagen in Milligramm							
10^{-5} IES	30,5 ± 5,3	23,7 ± 3,2	22,0 ± 4,3	−6,8 ± 1,4	0,0002	−8,5 ± 1,4	0,0002
− IES	18,9 ± 4,1	29,1 ± 3,7	28,0 ± 4,0	+10,2 ± 1,4	0,0002	+9,1 ± 1,3	0,0002
Δ	−10,6 ± 1,7	+5,4 ± 1,4	+6,0 ± 1,6				
P	0,0002	0,0005	0,0002				

Ein ganz anderes Bild zeigt das Wachstum der Kulturen, die *ohne* IES angesetzt wurden. In der ersten Passage werden die mit GS kultivierten Gewebe verglichen mit der Kontrolle ohne GS gehemmt. Diese

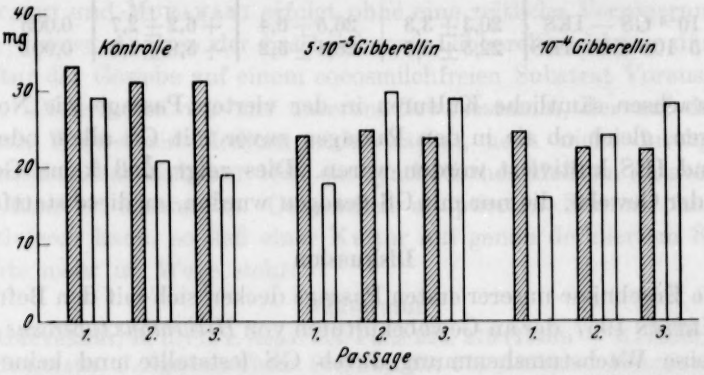


Abb. 1. Vergleich des Wachstums von Geweben von *Daucus carota* mit und ohne Gibberellinsäure und β-Indolylessigsäure. ■ + IES, □ − IES

Hemmung ist wesentlich stärker (40%) als die in den entsprechenden Kulturen mit IES (25%). In der zweiten Passage zeigt erwartungsgemäß die Kontrolle ohne GS einen weiteren Wachstumsrückgang, wohl als Folge einer zunehmenden Erschöpfung des Wuchsstoffspiegels der Gewebe. Die Kulturen mit GS verlieren dagegen nicht weiter an

Zuwachs, vielmehr wachsen sie über die Kontrolle —GS —IES und sogar über den Zuwachs der Serie +GS +IES hinaus. Dies prägt sich noch deutlicher in der dritten Passage aus, in der die Wachstumsdifferenzen zwischen den Kulturen +GS +IES und +GS −IES mit einem $P = 0{,}0005$ und $P = 0{,}0002$ gesichert sind. Die Kulturen +GS —IES erreichen dabei den Zuwachs der Normalkulturen, so daß man das Bild eines Ersatzes der IES durch GS erhält. Die 20 Parallelkulturen einer Serie erholten sich dabei in der zweiten und dritten Passage, abgesehen von geringen Wachstumsschwankungen, alle und die Wachstumszunahme ging auch nicht von eng begrenzten Teilen der einzelnen Kulturen aus, so daß hier nicht etwa das zuerst von GAUTHERET 1948 beschriebene Phänomen der „anergie à l'auxin" oder „habituation" vorliegt, das den Verlust der Auxinbedürftigkeit stets nur einiger weniger Kulturen in einer großen Serie zur Folge hat.

Werden von den mit GS ohne IES angezogenen Geweben am Ende der dritten Passage neue Kulturen auf Nährböden ohne IES und ohne GS angelegt, so ist das Wachstum der Kulturen ebenso gering wie das der ersten Kulturen —GS —IES, was ebenfalls gegen eine Habituation der Gewebe spricht (Tabelle 2). Auf normalen Nährböden mit 10^{-5} g/ml

Tabelle 2. *Rückübertragung der mit Gibberellinsäure ohne β-Indolylessigsäure kultivierten Gewebe auf gibberellinsäurefreie Nährböden. Zuwachs der Gewebe nach 49 Tagen in Milligramm*

Vorkultur	Normalkultur		Δ	P
	− IES	+ IES		
10^{-4} GS — IES	20,3 ± 3,3	26,5 ± 6,4	+ 6,2 ± 2,7	0,005
$5 \cdot 10^{-5}$ GS—IES	22,5 ± 5,5	28,4 ± 5,2	+ 5,9 ± 1,9	0,001

IES wachsen sämtliche Kulturen in der vierten Passage wie Normalkulturen, gleich ob sie in den Passagen zuvor mit GS allein oder mit GS und IES kultiviert worden waren. Dies zeigt, daß keine Gewöhnung der Gewebe, die nur mit GS gezogen wurden, an diese stattfindet.

Diskussion

Die Ergebnisse unserer ersten Passage decken sich mit den Befunden von NETIEN 1957, der an Gewebekulturen von *Helianthus tuberosus* ebenfalls eine Wachstumshemmung durch GS feststellte und keine synergistische Wirkung mit IES fand. Der bedeutend größere Wachstumsunterschied der mit und ohne IES gezogenen Kulturen NETIENS gegenüber unseren Kulturen dürfte darauf zurückzuführen sein, daß unsere Gewebe auf einem cocosmilchhaltigen Substrat wuchsen und der Wuchsstoffspiegel somit nicht bei Null lag wie in den Versuchen von NETIEN, sondern gegenüber den Kontrollen nur stark herabgesetzt war.

Bemerkenswert erscheint uns die in unseren Versuchen gefundene Tatsache, daß die Gewebe in Abwesenheit von IES in der zweiten und dritten Passage besser wachsen als die Kontrollen und den Zuwachs von Normalkulturen erreichen, während die Kulturen mit IES weiter konstant gehemmt werden. Auf eine mögliche Erklärung dieses Effekts könnten Versuche von HAYASHI und MURAKAMI 1953 hinweisen. Diese Autoren fanden an Sproßstücken von Erbsen, die sie 12 Std in destilliertem Wasser im Dunkeln hungern ließen, keine Wachstumssteigerung durch GS mehr, jedoch eine unveränderte Reaktion des Wachstums auf IES. Nach Zufuhr von Tryptophan reagierten die Sproßstücke wieder mit einer kräftigen Wachstumssteigerung auf GS. Ferner ließ sich das Wachstum unvorbehandelter Sproßstücke durch gleichzeitige Verabreichung von GS und Tryptophan in bedeutend stärkerem Maße steigern als durch je einen dieser Stoffe. Aus diesen Experimenten schlossen die Autoren, daß GS in dem vorliegenden Fall die Umwandlung von Tryptophan in IES fördert und über diesen Weg auf das Wachstum einwirkt. In unseren Versuchen konnte die Annahme einer durch GS hervorgerufenen IES-Produktion die Wachstumssteigerung der ohne IES angesetzten Kulturen in der zweiten und dritten Passage erklären und auch verständlich machen, warum diese in den Kulturen mit bereits optimaler IES-Versorgung ausbleibt, da hier eine zusätzliche IES-Produktion die Wuchsstoffwirkung möglicherweise in eine Hemmwirkung umschlagen läßt.

Ungeklärt bleibt bei der Annahme dieser Hypothese jedoch die anfängliche starke Hemmwirkung in der ersten Passage, denn die Einwirkung der GS auf den Tryptophanumbau in den Versuchen von HAYASHI und MURAKAMI erfolgt ohne eine zeitliche Verzögerung. Für eine weitere Analyse der beschriebenen Gibberellinwirkung dürfte die Kultur der Gewebe auf einem cocosmilchfreien Substrat Voraussetzung sein. Diese haben wir mit unserem Gewebestamm, der auf dem einfachen Whiteschen Medium nicht wächst, noch nicht durchgeführt. Inzwischen hat REINERT 1957 ein synthetisches Medium ausgearbeitet, auf dem er unseren an Cocosmilch adaptierten Stamm ohne diese kultivieren kann, so daß einer Kultur auf genau definiertem Substrat nichts mehr im Wege steht.

Literatur

GAUTHERET, R. J.: C. r. Acad. Sci. Paris **226**, 270 (1948). — HAYASHI, T., and Y. MURAKAMI: J. Agricult. Chem. Soc. Jap. **27**, 675 (1953). — MELCHERS, G., u. U. ENGELMANN: Naturwiss. **42**, 564 (1955). — NETIEN, G.: C. r. Acad. Sci. Paris **244**, 2732 (1957). — PÄTAU, K.: Biol. Zbl. **63**, 153 (1943). — REINERT, J.: Mündliche Mitteilung. — SACHS, R. W., and A. LANG: Science (Lancaster, Pa.) **125**, 1144 (1957). — STOVE, B. B., and T. YAMAKI: Annual Rev. Plant Physiol. 8, 181 (1957). WHITE, P. R.: The cultivation of animal and plant cells. New York 1954.

Dr. L. BERGMANN, Max-Planck-Institut für Biologie (Abteilung MELCHERS), Tübingen, Corrensstraße 41

Planta, Bd. 51, S. 74—83 (1958)

Aus dem Botanischen Institut der Universität Tübingen

ÜBER DEN PRIMÄRVORGANG BEI DER POLARISIERENDEN WIRKUNG DES LICHTES AUF KEIMENDE EQUISETUM-SPOREN*

Von

WOLFGANG HAUPT

Mit 11 Textabbildungen

(Eingegangen am 19. November 1957)

Über die Polarisierung der keimenden *Equisetum*spore oder des befruchteten *Fucaceen*-Eies durch Licht liegen zahlreiche Untersuchungen vor (vgl. insbes. die Literaturangaben bei MOSEBACH 1943 und HAUPT 1957). Doch ist noch wenig bekannt über die *primäre* Wirkung des Lichtes. Wir wissen, daß bei *Equisetum* die maßgebliche Lichtabsorption im Cytoplasma erfolgt (MOSEBACH), daß die Induktionswirkung des Lichtes unabhängig von der Temperatur während der Belichtung ist, daß das Reizmengengesetz in gewissen Grenzen gültig ist, daß bei genügend hoher Intensität bereits sehr kurze Belichtungszeiten (Elektronenblitz) erheblich wirksam sein können (HAUPT), und daß nur Wellenlängen unter 500 mμ für die Induktion in Frage kommen mit einem Maximum bei 450 mμ (MOSEBACH, HAUPT; der Bereich unter 300 mμ wurde bei *Equisetum* noch nicht geprüft, ist aber bei *Fucus* besonders wirksam). In der vorliegenden Untersuchung sollen diesen Tatsachen nun einige weitere Ergebnisse zur Charakterisierung der Primärreaktion hinzugefügt werden.

Allgemeine Methodik

Die Aussaat und Anzucht der Sporen erfolgte nach der früher beschriebenen Methode (HAUPT 1957). Meist wurde mit der Hg-Lampe belichtet, in vereinzelten Fällen mit der Niedervolt-Lampe bei 6,0 A. Da in vielen Versuchen der UV-Anteil der Hg-Lampe bestmöglich ausgenutzt werden sollte, mußte in verstärktem Maße auf die Aussaat *auf* statt *zwischen* Agar zurückgegriffen werden (in den Abbildungslegenden bezeichnet: „ohne Deckagar"). Das Licht der Hg-Lampe wurde durch Verwendung von 2 Quarzlinsen konzentriert; da in diesen Versuchen nicht mit Interferenzfiltern gearbeitet wurde und die zu bestrahlende Fläche klein war, konnte im Interesse möglichster Intensitätssteigerung eine leichte Konvergenz des Strahlenganges in Kauf genommen werden. Der Zeitpunkt der Belichtung nach der Aussaat wurde im allgemeinen so gewählt, daß er möglichst in das Maximum der sensiblen Phase fiel. Dieses lag bei den verschiedenen Arten etwas verschieden und hing offensichtlich von den Bedingungen ab, unter denen die Sporen zur Reife kamen; darüber soll später an anderer Stelle berichtet werden.

* Herrn Prof. Dr. Dr. h. c. WILHELM RUHLAND zum 80. Geburtstag gewidmet.

Sofern Aussaaten ohne Deckagar bei niederen Temperaturen belichtet werden sollten, konnte naturgemäß der Temperaturangleich nicht, wie früher beschrieben, im Wasserbad der entsprechenden Temperatur erfolgen; in diesem Falle wurden die Glasplatten in der entsprechend temperierten Dunkelkammer (Klimakammer) so lange auf einen glatten Eisblock gelegt (meist etwa 1 Stunde), bis sich auf der Oberfläche des Agars die ersten Anzeichen leichter Vereisung zeigten; dies wurde von den Sporen ohne weiteres vertragen.

Auch die Auswertung der Keimungsrichtungen sowie die Berechnung des Induktionsvektors „V" aus diesen (Prozentsatz der von der Induktion erfaßten Sporen im Gegensatz zu den zufallsmäßig verteilten) erfolgte wie in der vorhergehenden Untersuchung. Doch wurde in vielen Fällen eine Zwischenauswertung vorgenommen, wenn etwa die Hälfte der vorgesehenen Sporenzahl ausgezählt war; die Abweichung des so berechneten Induktionsvektors vom endgültigen gestattet eine Überprüfung der Genauigkeit der Werte. In Übereinstimmung mit der ereignisstatistischen Betrachtung des Induktionsvektors (HAUPT 1957) betrugen die Differenzen zwischen End- und Zwischenauswertung nur in seltenen Fällen 10%, meist nicht über 5%.

Experimenteller Teil

1. Die Sättigung der Lichtreaktion. Ein Ansatzpunkt für die weitere Analyse des Primärvorganges ergab sich durch die Feststellung, daß bei starken kurzen Belichtungen die begrenzende Reaktion schnell abgesättigt werden kann (HAUPT 1957); wird nämlich die Belichtung über ein Optimum hinaus gesteigert, so wird die polaritätsinduzierende Wirkung des Lichtes (statistisch gesehen) wieder geringer, verursacht dadurch, daß nun auch auf der Schattenseite der Spore die Reaktion in zunehmendem Ausmaß erfolgt, während auf der Lichtseite keine weitere Steigerung möglich ist. Dadurch muß der Gradient, der durch die ungleiche Belichtung in der Spore entsteht, naturgemäß geringer werden. Abb. 1 zeigt eine solche Wirkungskurve für *Equ. arvense*. Es ist nun zunächst von Interesse, wie lange dieser Sättigungszustand anhält bzw. unter welchen Bedingungen die ursprüngliche Lichtempfindlichkeit wiederhergestellt wird. Zu diesem Zweck wurden alle Sporen bis zum Kurvenminimum belichtet, also 25 sec (Punkt B in Abb. 1), so daß die Lichtreaktion sowohl auf der Lichtseite als auch auf der Schattenseite weitgehend gesättigt ist; eine sofort anschließende Belichtung von 2 (oder 5) sec, die für sich allein maximal polarisierende Wirkung hervorrufen würde (Abb. 1, Punkt A), ist unter diesen Umständen praktisch ohne Wirkung. Wird nun zwischen die erste Belichtung von 25 sec und die zweite von 2—5 sec eine hinreichend lange Dunkelphase eingeschoben, so kann die zweite Belichtung wieder volle Wirkung entfalten, die Lichtempfindlichkeit der Spore ist offensichtlich wiederhergestellt (nachgewiesen für die Lichtseite der Spore, die bei der Kürze dieser Belichtung praktisch allein reagiert). Diese Wiederherstellung der Empfindlichkeit läßt sich in ihrem zeitlichen Verlauf quantitativ verfolgen, wenn die Zeitspanne der Dunkelphase (die „Erholungszeit")

systematisch variiert wird. Abb. 2 gibt hierfür ein Beispiel, aus dem zu ersehen ist, daß bei 20° die Empfindlichkeit etwa 20 Minuten nach der ersten Belichtung wieder voll vorhanden ist, daß zu diesem Zeitpunkt also eine Belichtung so wirkt, als sei zuvor keine Abstumpfung erfolgt.

Die Regeneration der Empfindlichkeit muß ein chemischer Prozeß sein, der vermutlich an den Stoffwechsel gebunden ist. Es ist daher von Interesse, welchen Einfluß Außenfaktoren auf diese Regeneration ausüben. Geprüft wurde zunächst nur die Temperatur. Abb. 3 und 4

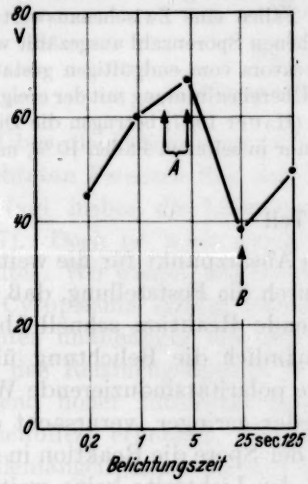


Abb. 1

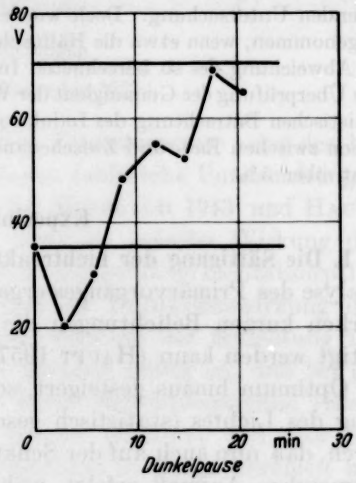


Abb. 2

Abb. 1. Die Abhängigkeit der Polaritätsinduktion von der Belichtungszeit bei hohen Lichtintensitäten. Abszisse: Belichtungszeit in sec (ungefiltertes Licht der Hg-Lampe). Ordinate: Induktionsvektor. Mit *A* und *B* sind die Belichtungszeiten angedeutet, die das erste Kurvenmaximum bzw. Minimum hervorrufen. *Equisetum arvense* (Versuch 246)

Abb. 2. Die induzierende Wirkung einer zweiten Belichtung in Abhängigkeit von der nach der ersten Belichtung verflossenen Zeitspanne bei 20° C. Erste Belichtung: 25 sec (Punkt *B* in Abb. 1), zweite Belichtung: 2 sec (Punkt *A* in Abb. 1), Hg-Lampe, ungefiltert. Abszisse: Dunkelpause zwischen erster und zweiter Belichtung in Minuten. Ordinate: Induktionsvektor. Die beiden waagerechten Linien bezeichnen die Kontrollen (erste bzw. zweite Belichtung allein). *E. variegatum* (Versuch 273)

zeigen an zwei Beispielen, daß bei 2° C die volle Empfindlichkeit erst nach etwa 4 Stunden wiederhergestellt ist, daß also die Erholung etwa 12mal so langsam vonstatten geht wie bei 20° C.

In diesen Fällen wurden auch die *Belichtungen* bei 2° C durchgeführt, da es nach der früheren Untersuchung ohne Belang ist, bei welchen Temperaturen die Belichtung erfolgt; doch wurde nochmals in zahlreichen Parallelversuchen sichergestellt, daß diese Temperatur*unabhängigkeit* unter den hier verwendeten Versuchsbedingungen streng gültig ist.

Eine Wiederherstellung der Empfindlichkeit könnte dadurch vorgetäuscht werden, daß nach einer gewissen Zeit (z. B. 20 Minuten bei 20° oder 4 Stunden bei 2°) der physiologische Zustand der Sporen-

population sich schon soweit verändert hat, daß ein zuvor noch unempfindlicher Anteil der Sporen lichtempfindlich geworden ist. Um diese Fehlerquelle auszuschalten, wurde in zahlreichen Kontrollversuchen zunächst nur 2 (oder 5) Sekunden belichtet und die Wirkung einer ebensolchen Belichtung nach der Erholungszeit geprüft. Da diese zweite Belichtung keine zusätzliche Induktion bewirkte, kann gefolgert werden, daß nach dieser Zeit der physiologische Zustand der Population noch nicht wesentlich verändert war. Auch bleibt die Wirkung der zweiten Belichtung bemerkenswert konstant, wenn die Dunkelphase über die notwendige Erholungszeit hinaus verlängert wird (Abb. 4); dies ist ebenfalls ein wichtiger Hinweis darauf, daß in der sensiblen Phase noch keine wesentliche Änderung eingetreten sein kann.

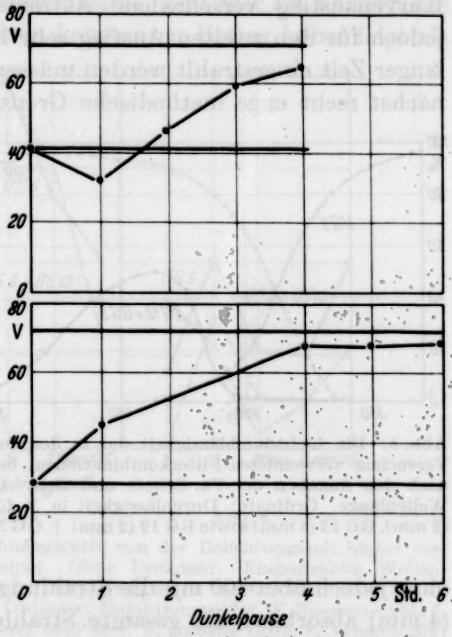


Abb. 3 und 4. Die induzierende Wirkung einer zweiten Belichtung in Abhängigkeit von der nach der ersten Belichtung verflossenen Zeitspanne bei 2° C. Bezeichnungen wie in Abb. 2, aber Dunkelpause in Stunden angegeben. *E. variegatum* (Versuche 274 und 281)

2. Der zweite Anstieg der Wirkungskurve. Die Kurve, die die Induktionswirkung in Abhängigkeit von der Belichtungszeit zeigt, steigt nach Durchlaufen des Minimums (Punkt B in Abb. 1) erneut an. In der vorhergehenden Untersuchung war auf eine exakte Deutung dieses Wiederanstiegs verzichtet worden; die damals erörterte Möglichkeit, daß sich bei den hierzu notwendigen längeren Belichtungszeiten bereits Empfindlichkeitsänderungen in der Population bemerkbar machen könnten, bedingt durch den Ablauf der sensiblen Phase, ist nach dem im vorigen Abschnitt Ausgeführten nicht mehr haltbar. Auch die weitere Möglichkeit, daß nun vielleicht die Erholungsvorgänge auf der Lichtseite schneller ablaufen könnten als auf der Schattenseite, wodurch die Verhältnisse recht unübersichtlich werden dürften, kann ausgeschaltet werden; der zweite Anstieg macht sich bei hinreichend starker Belichtung nämlich schon nach 2 Minuten bemerkbar, wenn die „Erholungsreaktion" noch kaum begonnen hat, und der Kurvenverlauf ist auch im Bereich des zweiten Anstiegs temperatur*unabhängig* im Gegensatz zu den Erholungsvorgängen. Die Beobachtung legt daher den Schluß nahe,

daß bei Einstrahlung großer Energien ein photochemischer Primärprozeß stattfindet, der sich von demjenigen unterscheidet, der für den ersten Kurvenanstieg verantwortlich ist. Es erscheint somit lohnend, nach Unterschieden in beiden Prozessen zu suchen.

Ein eindeutiger Nachweis für zwei verschiedene photochemische Primärprozesse wäre erbracht, wenn für den ersten und den zweiten Kurvenanstieg verschiedene Aktionsspektren gefunden würden. Da jedoch für den zweiten Anstieg sehr hohe Energien innerhalb nicht zu langer Zeit eingestrahlt werden müssen, sind der Untersuchung hier zunächst recht enge methodische Grenzen gesetzt. Statt eines vollständigen Aktionsspektrums konnte nur geprüft werden, ob das Verhältnis der Wirksamkeit willkürlich abgegrenzter Spektralbereiche für beide Kurvenanstiege gleich oder verschieden ist. Als brauchbar erwies sich die Verwendung folgender Schottfilter (Abb. 5):

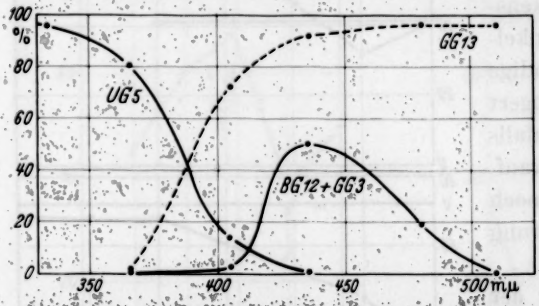


Abb. 5. Die Lichtdurchlässigkeit der in den folgenden Versuchen verwendeten Filterkombinationen, berechnet nach den Angaben der Fa. Schott und Gen. Abszisse: Wellenlänge, Ordinate: Durchlässigkeit in % für UG 5 (2 mm), GG 13 (4 mm) sowie BG 12 (2 mm) + GG 3 (2 mm)

1. UG 5 (2 mm) läßt im wesentlichen die Strahlung unter 400 mμ durch, ohne jedoch über 400 mμ die Strahlung restlos zu absorbieren. 2. GG 13 (4 mm) absorbiert die gesamte Strahlung unter 360 mμ und läßt über 400 mμ praktisch alles durch. Da sich die Strahlung hinter diesem Filter für den ersten Kurvenanstieg als wesentlich wirksamer erwies als diejenige hinter UG 5 (s. u.), wurde noch eine Filterkombination verwendet, die für den ersten Anstieg praktisch ebenso wirksam war wie UG 5, nämlich 3. BG 12 (2 mm) + GG 3 (2 mm) mit einer Durchlässigkeit ausschließlich zwischen 400 und 500 mμ. (Die Durchlässigkeit aller Filter bei größeren Wellenlängen kann hier unberücksichtigt bleiben, da in diesem Bereich keine induzierende Wirkung mehr vorhanden ist und da auf Energiemessungen verzichtet werden konnte.)

In einer ersten Versuchsreihe wurden die Wirkungskurven hinter diesen verschiedenen Filtern verglichen. Abb. 6 und 7 zeigen, daß der erste Kurvenanstieg und das erste Maximum hinter UG 5 etwa die 5fache Belichtungszeit benötigt wie hinter GG 13[1], daß aber die Kombination

[1] Die Angabe „5mal wirksamer" erhebt keinen Anspruch auf allzugroße Genauigkeit, da die Belichtungszeiten in geometrischer Progression mit dem Faktor 5 variiert wurden, so daß das Verhältnis der Wirksamkeiten statt 5 auch 4 oder 7 betragen kann. Zwei Versuche, in denen ausnahmsweise der Faktor 3 zur Anwendung kam, machen es wahrscheinlich, daß das Wirkungsverhältnis eher größer als 5 ist.

GG 3 + BG 12 bei gleicher Belichtungszeit den gleichen Effekt hervorruft wie UG 5. In Abb. 8 ist ein Versuch dargestellt, der alle 3 Belichtungsarten zusammenfaßt und die gleiche Gesetzmäßigkeit erkennen läßt. Diese Abbildung zeigt zugleich, daß für den zweiten Kurvenanstieg andere Verhältnisse vorliegen, indem nun GG 13 nicht mehr wirksamer ist als UG 5 und die Kombination GG 3 + BG 12 in ihrer Wirksamkeit weit hinter UG 5 zurückbleibt. Daß hier im übrigen die Kurve für UG 5 insgesamt um einen konstanten Betrag höher liegt als

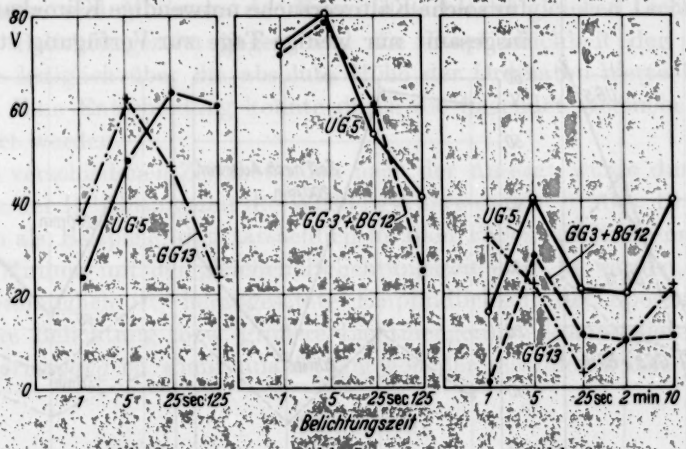


Abb. 6 Abb. 7 Abb. 8

Abb. 6—8. Die Polaritätsinduktion in Abhängigkeit von der Belichtungszeit hinter verschiedenen Filterkombinationen (Hg-Lampe). Ohne Deckagar. Eingestrahlte Wellenlängen: < 400 mμ (UG 5), > 400 mμ (BG 12 + GG 3) bzw. > 370 mμ (GG 13); vgl. Abb. 5). Abszisse: Belichtungszeit in sec und min. Ordinate: Induktionsvektor. *E. limosum* (Abb. 6, Versuch 250), *E. variegatum* (Abb. 7, Versuch 305) bzw. *E. palustre* (Abb. 8, Versuch 309)

die zu vergleichenden Kurven, hat methodische Gründe und ist für unsere Folgerungen belanglos.

Der naheliegende Schluß, daß die für den zweiten Kurvenanstieg verantwortliche Reaktion tatsächlich ein anderes Aktionsspektrum besitzt als die für den ersten Anstieg verantwortliche, ist jedoch noch nicht zwingend, da der Kurvenverlauf oberhalb des ersten Maximums mitbestimmt wird von der Durchlässigkeit der Spore für die betreffende Wellenlänge; denn von dieser Durchlässigkeit hängt das Ausmaß der Reaktion auf der Schattenseite ab. Nun konnte bis jetzt nicht nachgewiesen werden, daß die Durchlässigkeit oberhalb und unterhalb 400 mμ in der gleichen Größenordnung liegt. Deshalb wurde in einer zweiten Versuchsreihe die Abhängigkeit des zweiten Kurvenanstiegs von der Lichtqualität direkter als in der ersten Versuchsreihe untersucht. Mit einer Strahlung, die das Kurvenminimum möglichst ausgeprägt auftreten läßt, wurde einheitlich vorbelichtet (ungefiltertes Licht der Hg-Lampe, 20—25 sec oder BG 12 + GG 3, 2 min) und sofort

anschließend verschieden lang mit verschiedenen Lichtqualitäten weiter belichtet. Die Ergebnisse bestätigen vollauf die mit der ersten Methode gewonnenen, wie Abb. 9 als Beispiel zeigt.

Die Resultate gewinnen an Überzeugungskraft, wenn die zweite Belichtung über 10 Minuten hinaus auf 50 Minuten ausgedehnt wird. Dies ist jedoch nur bei niederen Temperaturen zulässig; denn die unter 1. beschriebenen Erholungsvorgänge dürften wohl auch während einer längeren *Belichtung* ablaufen. Da die für solche Kälteversuche notwendige Klimakammer insgesamt nur wenige Tage zur Verfügung stand[1],

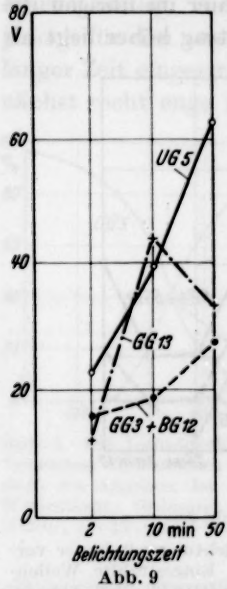


Abb. 9

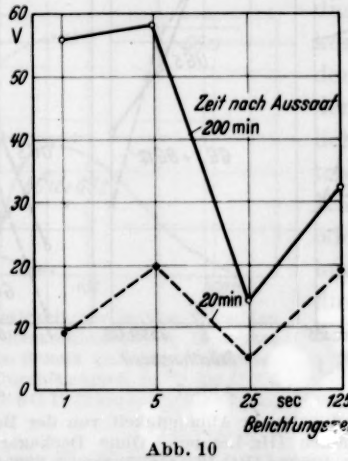


Abb. 10

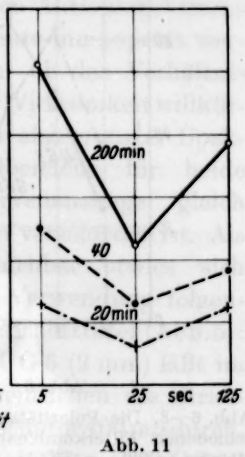


Abb. 11

Abb. 9. Die polarisierende Wirkung einer zweiten, langdauernden Belichtung in Abhängigkeit vom Spektralbereich. Ohne Deckagar. Erste Belichtung: Ungefiltertes Licht der Hg-Lampe bis zum Kurvenminimum (20 sec, Punkt *B* in Abb. 1), zweite Belichtung sofort anschließend hinter den angegebenen Filterkombinationen (vgl. auch Abb. 5 sowie 6—8). Abszisse: Belichtungszeit der zweiten Belichtung in Minuten. Ordinate: Induktionsvektor. Während der ganzen Belichtungszeit (erste + zweite Belichtung) waren die Sporen auf 2° abgekühlt (Temperaturangleichung 1 Stunde vor Versuchsbeginn). *E. palustre* (Versuch 312)

Abb. 10 u. 11. Die Polaritätsinduktion in Abhängigkeit von der Belichtungszeit zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Aussaat. Ungefiltertes Licht der Hg-Lampe. Abszisse: Belichtungszeit in Sekunden. Ordinate: Induktionsvektor. Belichtung 20, 40 und 200 Minuten nach der Aussaat. *E. arvense* (Versuche 223 und 229)

konnten nur drei Versuche mit derartig verlängerter Belichtung durchgeführt werden; sie stimmten jedoch im Prinzip gut überein. Hinter GG 13 trat in diesen Versuchen stets bei 50 Minuten Belichtungszeit ein zweiter Kurvenabfall auf (vgl. Abb. 9). Für eine Erklärung dieser Beobachtung ist noch umfangreicheres Versuchsmaterial erforderlich; es liegt nahe, an eine Analogie zum ersten Kurvenabfall zu denken.

3. Primärreaktion und sensible Phase. Es ist bekannt, daß das Licht seine maximale Induktionswirkung nur während einer relativ kurzen

[1] Herrn Dr. TAZAWA, der mehrmals die Pausen zwischen seinen Versuchen verlängerte, um mir die Möglichkeit zur Benutzung der Klimakammer zu geben, danke ich herzlich.

sensiblen Phase ausübt, die im Mittel etwa 4 Stunden nach der Aussaat ihren Höhepunkt erreicht. Diese sensible Phase ist der Ausdruck eines bestimmten physiologischen Zustandes der Spore und könnte entweder von Einfluß auf die Primärreaktion der Lichtwirkung sein oder nur für den Ablauf der Folgereaktionen von Bedeutung sein. Im ersten Falle müßte die in Abb. 1 dargestellte Wirkungskurve bei weniger empfindlichen Sporen nach rechts verschoben sein (gleiche Wirksamkeit bei höheren Lichtmengen), im zweiten Falle jedoch müßten Maximum und Minimum der Kurve stets bei der gleichen Lichtmenge (bzw. Belichtungszeit) liegen, und die Empfindlichkeit der Sporen würde lediglich über die absolute Höhe der Ordinaten-Werte bestimmen. Eine Entscheidung konnte durch die folgenden Versuche herbei geführt werden.

In verschiedenen Zeitabständen nach der Aussaat wurde durch Variieren der Belichtungszeit die Wirkungskurve ermittelt. Abb. 10 und 11 zeigen als Beispiele, daß tatsächlich in allen Fällen die Kurvenmaxima bzw. Minima mit der gleichen Belichtungszeit erreicht werden, daß es also unmöglich ist, herabgesetzte Empfindlichkeit der Sporen durch längere Belichtung (bzw. größere Lichtmengen) zu kompensieren. Der *Primärvorgang* ist somit unabhängig von der sensiblen Phase.

Diskussion

Die Ermüdung oder Sättigung der Reaktion darf wohl so aufgefaßt werden, daß eine für die Reaktion wesentliche Substanz verbraucht und erst nach angemessener Zeit wieder regeneriert oder neugebildet wird. Grundsätzlich wäre denkbar, daß es sich bei dieser Substanz entweder um das lichtabsorbierende Pigment handelt oder um den Stoff, der unter Vermittlung dieses Pigments durch das Licht verändert wird (im folgenden als Stoff „X" bezeichnet). Nun zeigt aber der zweite Kurvenanstieg, daß unter geeigneten Bedingungen noch eine weitere Steigerung der Reaktion möglich ist (offenbar mit Hilfe eines anderen Pigments, s. u.); die Annahme, daß die Sättigung auf einen Verbrauch des Stoffes X zurückzuführen ist, erscheint daher unzweckmäßig, und wir können folgern, daß die Menge des *Pigments* zum begrenzenden Faktor werden kann. Die Regeneration (oder Neubildung) dieses Pigments ist temperaturabhängig. Zwar wurden keine Versuche speziell zur Ermittlung des Q_{10} angesetzt, doch lassen die vorliegenden Ergebnisse eine ungefähre Abschätzung dieses Wertes zu. Eine Steigerung der Reaktionsgeschwindigkeit von 2—20° um das 12fache würde etwa einem Q_{10} von 4 entsprechen. Weitergehende Schlüsse aus dieser Berechnung zu ziehen scheint jedoch noch zu gewagt.

Der zweite Kurvenanstieg zeichnet sich durch eine relativ höhere Wirksamkeit des langwelligen UV gegenüber dem ersten Kurvenanstieg

aus, so daß hier mit Sicherheit nicht das gleiche Pigment für die Absorption verantwortlich sein kann. Ob in diesem Falle ein anderes Pigment die Reaktion einleitet oder ob hier (bei etwa 100facher Strahlungsenergie; vgl. Abb. 8) der Stoff „X" selbst schon die Lichtabsorption vollzieht[1], kann vorerst noch nicht entschieden werden. Jedenfalls haben wir mit zwei verschiedenen photochem. Primärprozessen zu rechnen, die sich in ihrem Energiebedarf und in ihrer Wellenlängenabhängigkeit voneinander unterscheiden, aber schließlich zum gleichen End-Ergebnis führen, ganz analog zu dem von MOHR (1957) beschriebenen Einfluß der Belichtung auf die Anthocyanbildung bei *Sinapis*-Keimlingen. Eine weitere Analyse, die von der Aufstellung eines genaueren Aktionsspektrums der zweiten Reaktion ausgehen muß, erfordert bei Einengung der Spektralbereiche erheblich längere Belichtungszeiten; vielleicht lassen sich derartige Versuche bei Anwendung niederer Temperaturen in gewissem Ausmaß durchführen.

Nach dem Muster der ersten Reaktion wäre zu erwarten, daß auch die zweite Reaktion zu einem Maximum mit anschließendem Wiederabfallen der Kurve führen müßte. Mit dem ungefilterten Licht der Hg-Lampe konnte davon jedoch selbst bei einer Belichtungsdauer von 4 Stunden (bei 2° C) nichts bemerkt werden. Das könnte einmal daran liegen, daß diese zweite Reaktion nicht so schnell abgesättigt wird, zum anderen aber auch, daß die Durchlässigkeit der Spore für die hier wirksamen Wellenlängen viel geringer ist als für den Spektralbereich, der die erste Reaktion hervorruft. Eine Entscheidung steht noch aus; es sei hier nur auf den regelmäßig wiederkehrenden Kurvenabfall hinter GG 13 bei 50minütiger Belichtung hingewiesen, der bei weiteren Untersuchungen zu berücksichtigen sein wird.

Die früher geäußerte Vermutung (WHITAKER 1941, HAUPT 1957), daß die primäre Lichtwirkung mehr oder weniger unabhängig von der sensiblen Phase ist, hat sich in den vorliegenden Versuchen bestätigt. Damit ist jedoch noch nicht der Nachweis erbracht, daß diese primäre Lichtwirkung tatsächlich zu jeder Zeit zu einer labilen Polarisierung führt, über deren Stabilisierung oder vorzeitiges Wiederabklingen der „Sensibilitätszustand" der Sporen entscheidet. Vorläufig muß noch die Möglichkeit offen bleiben, daß ein Schritt zwischen der primären Reaktion und der labilen Polarisierung nur im Maximum der sensiblen Phase optimal ablaufen kann. Eine weitere Diskussion dieser Frage ist ohne neue Versuchsergebnisse nicht sinnvoll.

[1] Ein Modellbeispiel wäre etwa die Photolyse der Indolessigsäure, einmal unter Mitwirkung von Riboflavin, zum anderen (bei genügend kurzwelliger Strahlung) durch eigene Absorption; daß aber diesem Modell im Zusammenhang mit unserem Versuchsobjekt bis jetzt keine Realität zugesprochen werden kann, wurde schon früher ausgeführt (HAUPT 1957).

Zusammenfassung

Die Lichtreaktion, die schließlich zur Polarisierung der *Equisetum*-spore führt, erreicht bei kurzen starken Belichtungen schnell einen Sättigungszustand. Eine erneute Reaktion ist bei gleichartiger Belichtung erst nach einer Erholungsphase im Dunkeln möglich. Die volle Reaktionsfähigkeit ist bei 20° nach etwa 20 Minuten, bei 2° nach etwa 4 Stunden wiederhergestellt. Sättigung und Wiederherstellung der Lichtempfindlichkeit beruhen wahrscheinlich auf Verbrauch und Regeneration (oder Neubildung) des die Lichtabsorption vollziehenden Pigments.

Aus dem Verlauf der Kurven, die die Abhängigkeit der Induktionswirkung von der Belichtungsdauer darstellen, läßt sich ein zweiter photochemischer Prozeß ableiten, der einen um 2—3 Größenordnungen höheren Energiebedarf besitzt. Für diesen zweiten Prozeß ist nicht das gleiche Pigment verantwortlich wie für den ersten, da die spektrale Empfindlichkeitsverteilung in beiden Fällen verschieden ist; der langwellige UV-Bereich ist für den zweiten Kurvenanstieg relativ wirksamer als für den ersten. Beim zweiten photochemischen Prozeß (der höhere Strahlungsenergien erfordert als der erste) ist eine Sättigung bis jetzt nicht nachweisbar.

Die primären Lichtreaktionen sind nicht an die sensible Phase der Sporen gebunden; der Verlauf der Wirkungskurven ist unabhängig vom Zeitpunkt der Belichtung nach der Aussaat, d. h. das Maximum liegt stets bei der gleichen Belichtungszeit, und entsprechendes gilt für das Minimum. Nur die absolute Höhe der Maxima und Minima ist am größten in der Mitte der sensiblen Phase.

Die Untersuchungen wurden durch eine großzügige Forschungs- und Sachbeihilfe der Deutschen Forschungsgemeinschaft unterstützt, wofür ich auch an dieser Stelle meinen herzlichen Dank aussprechen möchte. Für die zuverlässige Auszählung der Keimungsrichtungen von insgesamt etwa 200000 Sporen bin ich Herrn Dr. W. Maass zu großem Dank verpflichtet, ebenso Frau M. Kummerow-Beeck für ihre Hilfe bei der Vorbereitung zahlreicher Versuche.

Literatur

Haupt, W.: Die Induktion der Polarität bei der Spore von Equisetum. Planta (Berl.) **49**, 61—90 (1957). — Mohr, H.: Der Einfluß monochromatischer Strahlung auf das Längenwachstum des Hypocotyls und auf die Anthocyanbildung bei Keimlingen von Sinapis alba L. (= Brassica alba Boiss.). Planta (Berl.) **49**, 389—405 (1957). — Mosebach, G.: Über die Polarisierung der Equisetumspore durch das Licht. Planta (Berl.) **33**, 340—387 (1943). — Whitaker, D. M.: The effect of unilateral ultraviolet light on the development of the Fucus egg. J. gen. Physiol. **24**, 263—278 (1941).

Dozent Dr. Wolfgang Haupt,
Botanisches Institut der Universität, Tübingen, Wilhelmstraße 5.

Planta, Bd. 51, S. 84—98 (1953)

Aus dem Botanischen Institut der Universität Heidelberg

DIE KONSTANZ DES CHLOROPHYLLGEHALTES BEI LAUBBLÄTTERN IM LAUFE EINES TAGES

Von

ALEXANDER BAUER

Mit 2 Textabbildungen

(Eingegangen am 30. Oktober 1957)

I. Einleitung

Die grundlegenden Untersuchungen von WILLSTÄTTER und STOLL (1918) haben gezeigt, daß der Chlorophyllgehalt der Blätter in kürzeren Zeiträumen auffallend konstant bleibt und diese Konstanz des Pigmentgehaltes auch während der Photosynthese gewahrt wird. SEYBOLD und EGLE (1937, 1938) konnten ebenfalls bei ihren zahlreichen Pigmentanalysen niemals Tagesschwankungen des Farbstoffgehaltes und des Komponentenverhältnisses beobachten.

Im Gegensatz zu diesen Befunden stehen die Ergebnisse von BUKATSCH (1939), der bei alpinen Pflanzen (*Rumex alpinus* und *Adenostyles albifrons*) am natürlichen Standort Chlorophyllschwankungen um mehr als das Doppelte innerhalb weniger Stunden feststellte. Auch bei Pflanzen der gleichen Art aus dem Münchner Botanischen Garten fanden BUKATSCH (1940) und WENDEL (1940) beträchtliche tagesperiodische Schwankungen des Chlorophyllgehaltes, allerdings nicht wie bei den alpinen Formen mit einem Mittagsminimum, sondern einem Mittagsmaximum.

Die Bedeutung dieser Befunde für unsere pigmentphysiologischen Vorstellungen einerseits und ihre geringe Wahrscheinlichkeit im Hinblick auf frühere Untersuchungen andererseits veranlaßten SEYBOLD (1942) zu einer experimentellen Nachprüfung. Die von SEYBOLD über mehrere Tage hinweg durchgeführten Kontrollen stündlich frisch hergestellter Pigmentlösungen ließen keine Schwankungen erkennen, die über die Fehlergrenze seiner Methode hinausgingen. EGLE (1944) prüfte nochmals diese Frage an Gewächshauspflanzen, sowohl auf photometrischem Wege als durch Messung der Lichttransmission am lebenden Blatt. Aber auch er konnte keine meßbaren Pigmentschwankungen ermitteln.

Bereits ein Jahr später berichtete STEUER (1945)[1] wiederum über die „Tagesperiodische Veränderlichkeit des Chlorophyllgehaltes grüner Blätter". In letzter Zeit stellte nun SIRONVAL (1952) fest, daß vor allem junge Erdbeerblätter starken Tagesschwankungen des Chlorophyllgehaltes unterliegen. Auch russische Forscher (GJUBBENET und

[1] Unveröffentlichte Dissertation (München).

Bazanova 1955) haben spektralcolorimetrisch an Kartoffelblättern deutliche tagesperiodische Chlorophyllschwankungen gefunden. Bestärkt durch diese neueren Arbeiten versuchte Wendel (1957), seine früheren Ergebnisse zu rechtfertigen und als reversible Ausbleichungen der Pigmente zu deuten.

Durch die letztgenannten Veröffentlichungen erscheint die seit längerem als gesichert geltende Auffassung von der Konstanz des Chlorophyllgehaltes im Laufe eines Tages erneut zweifelhaft. Eine nochmalige Nachprüfung dieser für die Pigmentphysiologie wichtigen Frage wurde daher erforderlich. Wir waren uns darüber im klaren, daß diese Frage allerdings nur mit einer verfeinerten Methode und einer verbesserten Meßtechnik, die den bisher verwendeten überlegen ist, erfolgversprechend angegangen werden kann. Vergleicht man die neueren Befunde, so wird man feststellen, daß sie sich auf Angaben der Chlorophyllsumme a + b oder nur auf relative Werte stützen. Auch Wendel (1957) teilt bei seiner letzten Arbeit nur die Summe der beiden Chlorophylle mit. Dies ist verwunderlich, da ihm doch seither viel daran gelegen war, zu beweisen, daß seine chromatographische Trennung von Chlorophyll a und b fehlerfrei sei (1949, 1950). Lediglich Steuer (1945) hat die Chlorophyllkomponenten getrennt bestimmt.

Dank des methodischen Fortschrittes der vergangenen Jahre sind wir heute im Besitz des zuverlässigen Analysenverfahrens. Die Spektrophotometrie erlaubt uns innerhalb kürzester Zeiträume unter geringem Materialaufwand eine quantitative Bestimmung der Chlorophyllkomponenten ohne vorherige Trennung. Im nächsten Abschnitt soll davon ausführlicher die Rede sein.

Die mit dieser Methode in kurzen zeitlichen Intervallen durchgeführten Pigmentbestimmungen sowohl an ausgewachsenen als auch an jungen Blättern sollen in vorliegender Arbeit mitgeteilt werden. Im Anschluß daran wollen wir die zu unseren Ergebnissen in Widerspruch stehenden Befunde diskutieren.

II. Methodik

a) Versuchsobjekte. Bei der Auswahl unserer Versuchsobjekte mußte dem Lichtfeld, in dem die Pflanzen wuchsen, besondere Beachtung geschenkt werden. Haben doch Untersuchungen von Seybold (1934, 1936) und Egle (1937) ergeben, daß dem Lichtfaktor bei der Ausbildung der Pigmente ein entscheidender Einfluß zukommt. Damit sei allerdings nicht gesagt, daß andere Umweltfaktoren sowie die Konstitution der Pflanze keinen Einfluß auf die Pigmentbildung hätten. — Um eine ausreichende Zahl Analysen an ein und demselben Blatt ausführen zu können, kamen nur großblättrige Pflanzen und wiederum nur solche mit glatten und regelmäßigen Intercostalfeldern in Frage. Diesen Bedingungen genügten folgende Pflanzen[1]:

[1] Protokollauszüge mit Ergebnissen weiterer Versuchsobjekte stehen auf Anforderung zur Verfügung.

Freiland	Sonnenlichtfeld:	*Catalpa bungei*
		Datura aurea
		Ricinus communis
	Schattenlichtfeld:	*Rumex alpinus*
		Funkia subcordata
Treibhaus	Sonnenlichtfeld:	*Cyphomandra betacea*
	Schattenlichtfeld:	*Monstera deliciosa*
		Philodendron erubescens

Alle Pflanzen wuchsen im Botanischen Garten der Universität Heidelberg.

b) Bezugsgröße. Die richtige Wahl der Bezugsgröße ist bei allen pigmentphysiologischen Untersuchungen von maßgebender Bedeutung. Wegen der zeitlichen Schwankungen des Wassergehaltes im Laufe eines Tages kam das Frischgewicht als Bezugseinheit für uns nicht in Betracht. — Das Trockengewicht als Bezugsgröße ist nur dann zulässig, wenn im Verlaufe einer Untersuchung keine Substanz neu gebildet oder abgebaut wird. Da diese Voraussetzungen nicht erfüllt sind, schied die Bezugnahme auf das Trockengewicht ebenfalls aus. Außerdem dürften auch bei noch so schonender Trocknung des Blattmaterials Pigmentverluste unvermeidbar sein. — Für unsere Untersuchungen wählten wir die Blattfläche als Bezugssystem, da nur sie über kürzere Zeiträume als konstant angesehen werden kann. Auch für Analysen an jungen, noch wachsenden Blättern ist die Blattfläche als Bezugsgröße brauchbar: Man muß bei der Deutung der Ergebnisse dann allerdings berücksichtigen, daß in diesem Entwicklungsstadium der Blätter Wachstum und Pigmentbildung noch nicht abgeschlossen sind.

c) Extraktion. Unmittelbar nach der Entnahme wurde die Blattprobe mit Quarzsand und wenig Aceton in einem Mörser homogenisiert und mit weiteren 25 ml Aceton (p. a. Merck) erschöpfend extrahiert.

Nach COMAR und ZSCHEILE (1942) muß man bei Untersuchungen, die für ihre quantitative Auswertung konstante Größen erfordern, dieselben Analysenbedingungen einhalten, die bei der Ermittlung dieser Konstanten geherrscht haben. Da SMITH und BENITEZ (1955), deren spezifische Extinktionskoeffizienten wir bei unseren Berechnungen verwendeten, mit Aceton extrahierten, mußten auch wir mit Aceton als Extraktionsmittel arbeiten. — Eine Pigmentzerstörung tritt durch Extraktion mit Aceton nicht auf, wie folgender Versuch zeigt: Je 5 cm² Blattfläche von *Fagus silvatica* extrahierten wir einmal mit Aceton, das andere Mal mit Methanol. Das Ergebnis ist in Tabelle 1 zusammengefaßt. — Im übrigen hat Aceton gegenüber Methanol den Vorteil, daß das System Aceton-Äther, das — wie in unserem Fall — alle acetonlöslichen Stoffe des Blattes enthält, sich bei Zugabe von Wasser schneller und besser an der Grenzfläche entmischt.

Tabelle 1

Extraktionsmittel	Aceton	Methanol
Chlorophyll a . . .	0,152 mg/5 cm²	0,154 mg/5 cm²
Chlorophyll b . . .	0,048 mg/5 cm²	0,048 mg/5 cm²
Chlorophyll a + b. .	0,170 mg/5 cm²	0,172 mg/5 cm²
a/b	3,2	3,2

Im weiteren Verlauf unseres Analysenganges mußte der acetonische Extrakt abgenutscht und der Rückstand mit 10 ml Aceton und 5 ml Äther nachgewaschen werden. Der verwendete Äther war frei von Peroxyden (Prüfung mit Vanadin-Schwefelsäure). Nach Zugabe weiterer 20 ml Äther wurde die Aceton-Äther-

Pigmentlösung durch einen Langstieltrichter vorsichtig in 200 ml dest. Wasser eingegossen, wobei die Abtrennung der ätherischen Phase erfolgte. Die wasserlöslichen Pigmente verblieben in der Hypophase. Die ätherische Epiphase, die neben den Chlorophyllen die gesamten Carotinoidkomponenten enthält, mußte nach der Methode von MACKINNEY (1940) 3mal mit je 200 ml aqua dest. gewaschen werden. Anschließend wurde die ätherische Pigmentlösung in einem Meßkölbchen auf 25 ml aufgefüllt und ca. 1 Stunde bei 2° C im Kühlschrank getrocknet. Vom ausgefallenen Wasser wurde dekantiert und durch Nachfüllen von Äther das ursprüngliche Volumen wiederhergestellt. Die Dauer der Aufarbeitung des Blattmaterials betrug maximal 20 Minuten. Sofern die Lösungen nicht unmittelbar danach zur Messung kamen, verblieben sie im Kühlschrank (2° C), höchstens jedoch für 10 Stunden. Eine Verminderung des Farbstoffgehaltes trat auch bei längerer Aufbewahrung nicht auf.

Bestand wie z. B. bei *Rumex* die Gefahr einer Phäophytinbildung durch Oxalateinschlüsse, so führten wir das gesamte Chlorophyll quantitativ in Phäophytin über. Hierzu bedienten wir uns der Arbeitsmethode von SMITH und BENITEZ (1955): Die ätherische Pigmentlösung wurde auf ca. 5° C abgekühlt, mit 1 ml konz. HCl versetzt und 12 Stunden bei dieser Temperatur belassen. Da nach LIVINGSTON et al. (1953) das Phäophytinspektrum p_H-abhängig ist, mußte die salzsaure Lösung 5mal gewaschen werden, bis der p_H-Wert der Lösung ~ 5 war. Im Anschluß daran behandelten wir die Pigmentlösung wie oben angegeben.

d) Quantitative Bestimmung der Pigmente[1]. Die quantitative Bestimmung von Chlorophyll a und b und ihren Phäophytinen erfolgte spektrophotometrisch aus dem ätherischen Gesamtextrakt. Die Messungen führten wir mit einem Unicam-Spektrophotometer SP 500 mit Sekundärelektronen-Vervielfacher IP 28 (SZG 500) aus. Die Schichtdicke der Cüvette betrug 1 cm. Die Extinktionswerte (E) wurden an den Hauptabsorptionsmaxima der Chlorophylle im Rot bei 662 nm und 644 nm (für Phäophytine bei 667 nm und 655 nm) bestimmt. Unseren Berechnungen legten wir — wie oben bereits erwähnt — die spezifischen Extinktionskoeffizienten (α) von SMITH und BENITEZ (1955) zugrunde. Zu denselben Koeffizienten konnte in jüngster Zeit auch FALK (1957) auf einem analytisch anderen Wege gelangen. Mittels dieser Faktoren bestimmten wir nun nach folgenden Gleichungen, die sich vom Lambert-Beerschen Gesetz ableiten, die Konzentration der Pigmente in mg/L:

$$C_{\text{Chl. a}} = 10{,}1 \cdot E_{662} - 1{,}01 \cdot E_{644}$$
$$C_{\text{Chl. b}} = 16{,}4 \cdot E_{644} - 2{,}57 \cdot E_{662}$$

$$C_{\text{Ph. a}} = 16{,}7 \cdot E_{667} - 3{,}20 \cdot E_{655}$$
$$C_{\text{Ph. b}} = 25{,}3 \cdot E_{655} - 8{,}10 \cdot E_{667}$$

e) Prüfung der Methode. Wie leicht man durch Anwendung einer mangelhaften Methode zu falschen Ergebnissen kommen kann, hat SEYBOLD (1942) an Hand der von BUKATSCH mitgeteilten Resultate bereits dargelegt.

Wir hielten es daher für unerläßlich, unsere Methode mit einem anderen bewährten Analysenverfahren der quantitativen Pigmentbestimmung zu vergleichen. Diese zweite Methode hatten wir in der säulenchromatographischen Adsorptionsanalyse, wie sie seit Jahren im hiesigen Botanischen Institut für die Trennung der Chloroplastenfarbstoffe (SEYBOLD und EGLE 1938) mit Erfolg angewendet wird.

Zum Vergleich wurde ein methanolischer Rohchlorophyllextrakt aus 50 cm² Blattfläche von *Fagus silvatica* auf genau 60 ml aufgefüllt. Aus

[1] Herrn Dozenten Dr. H. I. VIRGIN, der mich anläßlich eines Studienaufenthaltes am Botanischen Institut der Universität Lund-Schweden in dieses Analysenverfahren einführte, sei auch an dieser Stelle gedankt.

10 ml der Lösung bestimmten wir den Gehalt an Chlorophyll a und b — wie oben beschrieben — unmittelbar nach Überführung der Pigmente in Äther aus dem Gesamtextrakt. Mit den übrigen 50 ml der Lösung nahmen wir eine säulenchromatographische Trennung der Komponenten vor und ermittelten danach die Konzentration der getrennten Chlorophylle spektrophotometrisch. Die Ergebnisse wurden auf gleiche Ausgangsmengen umgerechnet. Das Resultat dieser Gegenüberstellung zeigt Tabelle 2.

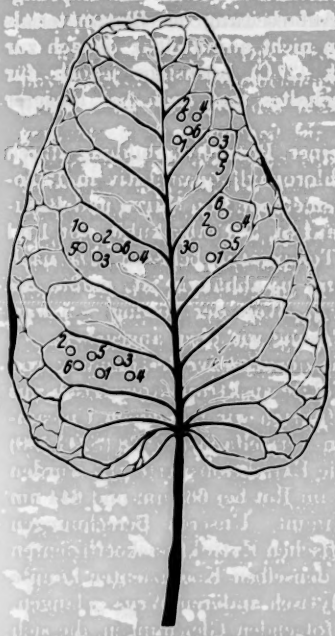


Abb. 1. Verteilung der Stanzstücke für 6 Analysen am Beispiel von *Rumex alpinus*. Diese Art der Probeentnahme wiederholt sich an einem zweiten Blatt spiegelbildlich. Die mit gleichen Zahlen versehenen Stanzstücke stellen das Ausgangsmaterial für eine Analyse dar

Tabelle 2. *Bestimmung des Chlorophyllgehaltes* (mg/40 cm² Blattfläche)

	1. nach säulenchromatographischer Trennung	2. aus dem Gesamtextrakt
Chlorophyll a . .	1,10	1,12
Chlorophyll b . .	0,32	0,33
Chlorophyll a + b	1,42	1,45
a/b	3,4	3,4

Die gute Übereinstimmung der Ergebnisse beider Methoden beweist uns einmal, daß sich die Extinktionswerte (E) der Komponenten in Lösung tatsächlich addieren, wie es die Theorie fordert. Zum anderen bestätigt das Ergebnis erneut eine einwandfreie Trennung der Stoffe auf säulenchromatographischem Wege. Ein kaum ins Gewicht fallender Verlust an Substanz bei einer chromatographischen Aufarbeitung dürfte auch für den geübten Analytiker unvermeidbar sein.

f) Versuchsanordnung. Durch Untersuchungen von NAGEL (1940) wissen wir, daß die Pigmentverteilung innerhalb eines Blattes stark variieren kann. So beträgt z. B. beim wachsenden Tabakblatt die Differenz des Farbstoffgehaltes zwischen Basis und Spitze 300—400%.

Wir haben aus diesem Grunde die in der Regel für jede Analyse erforderlichen 4 cm² Blattfläche nicht an einer Stelle der Spreite entnommen, sondern in Stanzstückchen von je $^1/_2$ cm² über das Blatt verteilt. Bei kleinflächigeren Blättern mußten die 8 Probestückchen aus 2 bzw. 4 Blättern desselben Entwicklungsstadiums ausgestanzt werden. Die Blattproben für die nachfolgenden Analysen verteilten wir über die Blattfläche, wie es die Abb. 1 zeigt.

Auf diese Weise war es möglich, die Pigmentbestimmung einer Tages- und Nachtserie in kurzen zeitlichen Intervallen an ein und demselben Blatt zu wiederholen, ohne dadurch die Blattfläche in der Regel um mehr als 5% reduzieren zu müssen. Ein solcher Eingriff dürfte den Stoffwechsel des Blattes und der Pflanze

nicht beeinträchtigen. Äußerlich zumindest waren an den Blättern keine Schädigungen zu beobachten wie etwa Bräunung im Bereich der Stanzstücke.

Stand eine ausreichende Zahl Pflanzen zur Verfügung, so ließen wir häufig ein oder zwei Versuchsserien parallel zueinander laufen. In manchen Fällen gelang es, die Versuche in einem zweiten Tagesgang fortzusetzen.

Durch unsere Art der Versuchsanordnung konnten wir erreichen, daß der mittlere Fehler für 3 oder 5 gleichzeitig an einem Blatt durchgeführte Analysen für beide Chlorophyllkomponenten kleiner als 2% blieb. Am geringsten war die Abweichung bei *Funkia*, bei der der Fehler sowohl für Chlorophyll a als für Chlorophyll b gerade 1% betrug, am größten bei *Cyphomandra*, bei der er sich für Chlorophyll a auf $\pm 1{,}5\%$, für Chlorophyll b auf $\pm 2\%$ belief. Tagesschwankungen des Pigmentgehaltes müssen also die Grenzwerte unserer Methode von $\pm 2\%$ übersteigen, sollen sie als gesichert gelten.

Zum besseren Vergleich der Werte rechneten wir die Ergebnisse unserer Analysen auf mg in 10 cm^2 Blattfläche um.

III. Ergebnisse

1. Pigmentbestimmungen an ausgewachsenen Blättern

Zunächst sollen unsere Versuchsergebnisse von *Rumex alpinus* mitgeteilt werden (Tabelle 3). Die Daten dieser Versuchsserie lassen innerhalb 24 Stunden keine Chlorophyllschwankungen erkennen, die den Fehlerbereich unserer Methode überschreiten. Der Quotient a/b bleibt

Tabelle 3. *Rumex alpinus: Tagesverlauf des Chlorophyllgehaltes eines ausgewachsenen Blattes*

Datum: 10./11. 7. 57. Erklärung zu den Phäophytinwerten s. Text S. 89.

Zeit	mg Chlorophyll in 10 cm^2 Blattfläche			a/b	mg Phäophytin in 10 cm^2 Blattfläche			a/b
	a	b	a + b		a	b	a + b	
8^h	0,318	0,118	0,436	2,7	0,312	0,120	0,432	2,6
10^h	0,315	0,118	0,433	2,7	0,312	0,125	0,437	2,6
12^h	0,315	0,118	0,433	2,7	0,312	0,120	0,432	2,6
14^h	0,318	0,118	0,436	2,7	0,315	0,125	0,440	2,6
16^h	0,315	0,118	0,433	2,7	0,312	0,125	0,437	2,6
18^h	0,318	0,118	0,436	2,7	0,310	0,120	0,430	2,6
20^h	0,318	0,118	0,436	2,7	0,312	0,120	0,432	2,6
24^h	0,320	0,120	0,440	2,7	0,315	0,125	0,440	2,6
8^h	0,315	0,118	0,433	2,7	0,312	0,120	0,432	2,6

während der Versuchsdauer konstant. Die zur Kontrolle ermittelten Phäophytinwerte liefern einen zusätzlichen Beweis für die Konstanz des Pigmentgehaltes im Laufe eines Tages. Wir können also die Ergebnisse von Bukatsch und Wendel, die am gleichen Objekt tagesperiodische Schwankungen des Chlorophyllgehaltes feststellen konnten, nicht bestätigen. Bemerkt sei noch, daß Wendel (1957) bei der Angabe seiner Maßeinheit wahrscheinlich ein Fehler unterlaufen ist. Es muß dort wohl „γ" anstatt „mg" heißen.

Funkia subcordata stellte für uns insofern ein interessantes Versuchsobjekt dar, als sich ihr Lichtfeld im Ablauf des Tages änderte: In den Morgen- und Abendstunden stand die Pflanze im Grünschatten des Blätterdaches der umstehenden Bäume, in den Mittagsstunden (11 bis 15 Uhr) war sie der vollen Sonneneinstrahlung ausgesetzt. — Trotz dieser wechselnden Bedingungen weisen die Analysenergebnisse von *Funkia* (Tabelle 4) keine kurzfristigen Chlorophyllschwankungen auf. Zwei weitere Analysenserien an *Funkia*-Blättern zeitigten dasselbe Resultat. Wir können deshalb darauf verzichten, diese Werte tabellarisch wiederzugeben.

Tabelle 4. *Funkia subcordata: Tagesverlauf des Chlorophyllgehaltes eines ausgewachsenen Blattes*
Datum: 1./3. 7. 57

Zeit	mg Chlorophyll 10 cm² Blattfläche			a/b
	a	b	a + b	
8h	0,185	0,072	0,257	2,6
13h	0,183	0,072	0,255	2,5
18h	0,185	0,072	0,257	2,6
24h	0,185	0,072	0,257	2,6
6h	0,183	0,072	0,255	2,5
11h	0,183	0,072	0,255	2,5

Die Ergebnisse einer nächsten Versuchsreihe (Tabelle 5) mit Sonnenblättern von *Catalpa bungei* bestätigen erneut die Konstanz des Chlorophyllgehaltes während des Tages und der Nacht. Am zweiten Tag der Versuchsserie wurden die Blätter vom Baum abgenommen und in Leitungswasser an ein Nordfenster gestellt. Die Blätter blieben dabei voll turgeszent. Nach diesem Eingriff waren ebensowenig Chlorophyllschwankungen festzustellen. Erst am nächsten Tag setzte der Abbau ein, wobei Chlorophyll a der b-Komponente vorauseilte.

Tabelle 5. *Catalpa bungei: Tagesverlauf des Chlorophyllgehaltes eines ausgewachsenen Blattes*
Datum: 24./26. 7. 57

Zeit	mg Chlorophyll in 10 cm² Blattfläche			a/b
	a	b	a + b	
9h	0,270	0,095	0,365	2,8
12h	0,272	0,095	0,367	2,9
15h	0,267	0,095	0,362	2,8
18h	0,272	0,095	0,367	2,9
23h	0,265	0,093	0,358	2,9
8h	0,267	0,093	0,360	2,9
14h	0,270	0,095	0,365	2,8
20h	0,267	0,095	0,367	2,8
9h	0,257	0,095	0,352	3,0

Auch einige Treibhauspflanzen wählten wir zu unseren Untersuchungen aus.

Die an Blättern von *Cyphomandra betacea* gewonnenen Versuchsergebnisse sind in Tabelle 6 zusammengefaßt. Sämtliche über zwei Tage hinweg ermittelten Werte liegen innerhalb der Fehlergrenze der Methode von $\pm 2\%$. Der Quotient a/b ist praktisch konstant. Die tabellarische Darstellung zweier Wiederholungsserien an der gleichen Pflanze erübrigt sich, da sich auch aus diesen Werten keine Pigmentschwankungen ergeben. — Der am zweiten Untersuchungstag einsetzende Wetterwechsel (1. Tag: keine Bewölkung, sonnig — 2. Tag: wechselnde bis starke Bewölkung, trüb) änderte nichts an der Konstanz des Chlorophyllgehaltes. Wir können damit die von BUKATSCH (1939) als merkwürdig bezeichnete Erscheinung, „daß an trüben und bewölkten Tagen die Senkung der Blattgrün-

menge nicht weniger, sondern eher noch deutlicher ausgesprochen ist als bei Schönwetter", nicht bestätigen.

Versuchsreihen an den Treibhauspflanzen *Monstera deliciosa* und *Philodendron erubescens* (Tabelle 7 u. 8) lieferten ebenfalls keinen Hinweis auf das Vorkommen tagesperiodischer Chlorophyllschwankungen beim ausgewachsenen Blatt.

2. *Pigmentbestimmungen an jungen Blättern*

Im weiteren galt es zu klären, wie sich der Chlorophyllgehalt im jungen, noch wachsenden Blatt im Laufe eines Tages verhält. Von vorneherein muß man sich beim jungen Blatt im klaren darüber sein, daß hier neben Umwelteinflüssen noch Entwicklungsfaktoren zusätzlich zu berücksichtigen sind.

Was sagen die an jungen Blättern durchgeführten Analysen aus und wie lassen sich ihre Ergebnisse deuten? (Tabelle 9 u. 10.) Zuvor jedoch sei der besseren Anschaulichkeit halber noch die Chlorophyllsumme a + b dieser Versuchsobjekte graphisch dargestellt (Abb. 2).

Auffallend ist zunächst der allen vier Kurven gemeinsame Anstieg des Chlorophyllgehaltes vom Morgen bis zum späten Nachmittag entsprechend der progressiven Chlorophyllbildung im jungen Blatt bei Belichtung. Das erreichte Chlorophyllniveau bleibt dann bis zum Einbruch der Dämmerung mehr oder weniger unverändert. Verfolgen wir den Chlorophyllspiegel unserer Versuchsobjekte über die Nachtstunden hinweg, so bleibt er bei *Monstera* und *Philodendron* auch weiterhin konstant, während er sich bei *Ricinus* und *Datura* wieder

Tabelle 6. *Cyphomandra betacea: Tagesverlauf des Chlorophyllgehaltes eines ausgewachsenen Blattes*
Datum: 3./5. 7. 57.

Zeit	mg Chlorophyll in 10 cm² Blattfläche			a/b
	a	b	a + b	
8^h	0,465	0,210	0,675	2,2
12^h	0,465	0,205	0,670	2,3
16^h	0,460	0,205	0,665	2,2
20^h	0,460	0,210	0,670	2,2
24^h	0,465	0,210	0,675	2,2
5^h	0,462	0,210	0,672	2,2
9^h	0,470	0,212	0,682	2,2
14^h	0,472	0,210	0,682	2,2
20^h	0,470	0,210	0,680	2,2
8^h	0,467	0,210	0,677	2,2

Tabelle 7. *Philodendron erubescens: Tagesverlauf des Chlorophyllgehaltes eines ausgewachsenen Blattes*
Datum: 14./15. 8. 57

Zeit	mg Chlorophyll in 10 cm² Blattfläche			a/b
	a	b	a + b	
8^h	0,472	0,197	0,669	2,4
13^h	0,467	0,195	0,662	2,4
18^h	0,482	0,197	0,669	2,4
8^h	0,465	0,197	0,662	2,4

Tabelle 8. *Monstera deliciosa: Tagesverlauf des Chlorophyllgehaltes eines ausgewachsenen Blattes*
Datum: 12./13. 8. 57

Zeit	mg Chlorophyll in 10 cm² Blattfläche			a/b
	a	b	a + b	
8^h	0,730	0,318	1,048	2,3
13^h	0,725	0,318	1,043	2,3
18^h	0,727	0,318	1,045	2,3
24^h	0,722	0,315	1,037	2,3
8^h	0,722	0,315	1,037	2,3
12^h	0,725	0,318	1,043	2,3
8^h	0,727	0,318	1,045	2,3

Tabelle 9. *Tagesverlauf des absoluten und relativen* [1] *Chlorophyllgehaltes eines jungen Blattes von*

Zeit	*Ricinus communis* 17. 7. 57			*Datura aurea* 26. 7. 57		
	mg Pigment in 10 cm² Blattfläche		a/b	mg Pigment in 10 cm² Blattfläche		a/b
	a	b		a	b	
8h	0,255 (*100*)	0,080 (*100*)	3,2	0,345 (*100*)	0,150 (*100*)	2,3
13h	0,260 (*102*)	0,085 (*106*)	3,1	0,363 (*106*)	0,165 (*110*)	2,2
16h	0,268 (*105*)	0,090 (*112*)	3,0	0,390 (*113*)	0,175 (*116*)	2,2
20h	0,267 (*105*)	0,090 (*112*)	3,0	0,387 (*112*)	0,173 (*115*)	2,2
24h	0,263 (*103*)	0,088 (*110*)	3,0	0,368 (*107*)	0,165 (*110*)	2,2
8h	0,260 (*102*)	0,083 (*104*)	3,1	0,360 (*104*)	0,157 (*105*)	2,3
13h	0,270 (*106*)	0,090 (*112*)	3,0	0,365 (*107*)	0,162 (*108*)	2,2

[1] Relative Werte: kursiv.

Tabelle 10. *Tagesverlauf des absoluten und relativen* [1] *Chlorophyllgehaltes eines jungen Blattes von*

Zeit	*Monstera deliciosa* 12. 8. 57			*Philodendron erubescens* 14. 8. 57		
	mg Pigment in 10 cm² Blattfläche		a/b	mg Pigment in 10 cm² Blattfläche		a/b
	a	b		a	b	
8h	0,200 (*100*)	0,090 (*100*)	2,2	0,185 (*100*)	0,062 (*100*)	3,0
13h	0,215 (*108*)	0,098 (*109*)	2,2	0,195 (*105*)	0,075 (*121*)	2,7
18h	0,220 (*110*)	0,103 (*114*)	2,1	0,203 (*110*)	0,078 (*126*)	2,6
24h	0,220 (*110*)	0,103 (*114*)	2,1	0,203 (*110*)	0,078 (*126*)	2,6
8h	0,220 (*110*)	0,103 (*114*)	2,1	0,202 (*109*)	0,078 (*126*)	2,6
12h	0,228 (*114*)	0,108 (*120*)	2,1	—	—	—

[1] Relative Werte: kursiv.

etwas erniedrigt. Bei einsetzender Belichtung steigt bei allen untersuchten Pflanzen der Chlorophyllgehalt wieder an. Das unterschiedliche Verhalten während der Nacht erklärt sich zwanglos: Bei *Monstera* und *Philodendron* ist das Blatt in der Knospe schon fast vollständig ausgebildet und läßt nach der Entfaltung neben der beginnenden Chlorophyllbildung nur noch ein geringes Streckungswachstum der Spreite erkennen. Bei *Ricinus* und *Datura* hingegen, bei denen sich das junge Blatt in einem frühen Entwicklungsstadium bereits voll entfaltet, läuft der Ergrünungsprozeß mit regem Blattwachstum parallel, so daß aus der Fortdauer der Flächenzunahme und dem gleichzeitigen Stillstand des Ergrünungsvorganges bei Nacht eine scheinbare Abnahme des Chlorophyllgehaltes resultiert. Die unter Einwirkung des Tageslichtes gebildete Chlorophyllmenge wird also bei Nacht lediglich auf eine größere Fläche verteilt.

Zu demselben Schluß gelangte NAGEL (1940) in seiner Arbeit über die jahreszeitliche Zunahme des Chlorophyllgehaltes bei Tabakblättern:

„Aus der Zu- oder Abnahme der Farbstoffmengen pro Flächeneinheit läßt sich noch nicht mit Sicherheit auf eine absolute Zu- oder Abnahme der Farbstoffe schließen."

Daß es sich bei der tagsüber erfolgenden Erhöhung des Chlorophyllspiegels lediglich um einen bei Belichtung ablaufenden Vorgang der Pigmentbildung handelt, kann folgender einfache Versuch erhellen: Werden *Philodendron*- oder *Datura*-Pflanzen über Tag im Dunkeln gehalten, so ist bei jungen Blättern von *Philodendron* ein Stillstand, evt. eine geringfügige Abnahme, bei *Datura* die auf Grund unserer Versuche erwartete Chlorophyllabnahme zu beobachten (Tabelle 11 und 12).

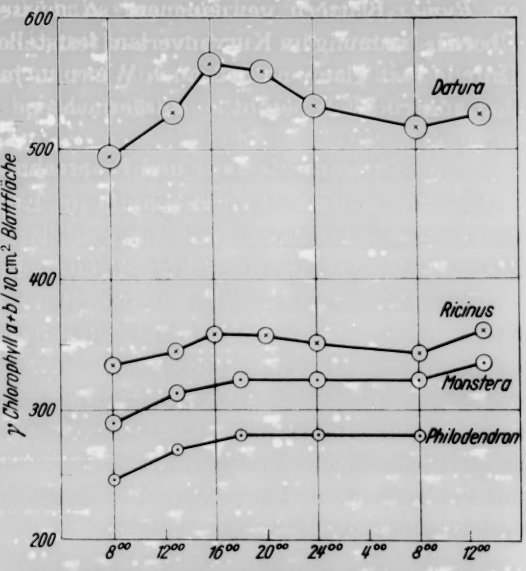


Abb. 2. Relativer Chlorophyllgehalt (Chl. a + b pro Flächeneinheit) eines jungen, noch wachsenden Blattes im Verlaufe eines Tages. Die Durchmesser der Kreise in der Vertikalen entsprechen der prozentual möglichen Streuung des jeweiligen Wertes

Auch SIRONVAL (1952) zeitigte bei seinen Untersuchungen an jungen Erdbeerblättern ähnliche Ergebnisse. Nur seiner Deutung können wir uns nicht anschließen. SIRONVAL will die beobachtete Chlorophyllzu- und -abnahme als einen gleich- bzw. gegenläufigen Synthese-Hydrolyseprozeß verstanden wissen. Was hat man sich aber unter einer Chlorophyllhydrolyse vorzustellen? Wenn SIRONVAL möglicherweise unter dem Hydrolyseprodukt des Chlorophylls das Chlorophyllin verstehen

Tabelle 11. *Philodendron erubescens: Tagesverlauf des Chlorophyllgehaltes eines jungen, verdunkelten Blattes*
Datum: 17./18. 8. 57

Zeit	mg Chlorophyll in 10 cm² Blattfläche			a/b
	a	b	a + b	
8h	0,160	0,072	0,232	2,2
13h	0,158	0,070	0,228	2,2
18h	0,155	0,070	0,225	2,2
8h	0,155	0,070	0,255	2,2

Tabelle 12. *Datura aurea: Tagesverlauf des Chlorophyllgehaltes eines jungen, verdunkelten Blattes*
Datum: 7. 8. 57

Zeit	mg Chlorophyll in 10 cm² Blattfläche			a/b
	a	b	a + b	
7h	0,385	0,145	0,530	2,7
13h	0,375	0,145	0,520	2,6
18h	0,358	0,140	0,498	2,6

sollte, so müßte es in unserem Analysengang in der wäßrigen Hypophase aufgetreten sein. Dies war jedoch nicht der Fall. Näher auf SIRONVALS Hypothese einzugehen, halten wir für verfrüht, da wir über den Chlorophyllabbau in vivo heute noch so gut wie nicht unterrichtet sind.

Vergleichen wir noch unsere Kurven mit den von WENDEL (1957) an *Rumex*-Blättern gewonnenen, so müssen wir eine überraschende Übereinstimmung im Kurvenverlauf feststellen. Wir möchten aus diesem Grunde fast glauben, daß auch WENDEL junge und nicht — wie von ihm ausdrücklich betont — ausgewachsene Blätter analysiert hat.

Zusammenfassung und Besprechung der Ergebnisse

Das Verhalten der Chlorophylle im Laufe eines Tages wurde von uns an ausgewachsenen und jungen Blättern mit einer verfeinerten Methode der quantitativen Pigmentbestimmung verfolgt.

1. In Übereinstimmung mit den Befunden von WILLSTÄTTER und STOLL sowie von SEYBOLD und EGLE haben unsere Untersuchungen ergeben, daß der Chlorophyllgehalt ausgewachsener Blätter während des Tages und der Nacht keine meßbaren kurzfristigen Schwankungen zeigt. Auch erfährt dabei das Verhältnis der beiden Chlorophylle — ausgedrückt durch den Quotienten a/b — keine Veränderung, wie wir mit der getrennten Ermittlung der absoluten Werte von Chlorophyll a und b nachweisen konnten.

Im übrigen gelangten BODE (1942) bei *Kalanchoe blossfeldiana* und neuerdings RÖBBELEN (1957) an *Arabidopsis thaliana* zu dem gleichen Ergebnis.

2. Bei der analytisch erfaßbaren Zu- und Abnahme des Chlorophyllgehaltes junger Blätter handelt es sich nicht um kurzfristige, reversible Chlorophyllschwankungen im Sinne einer rhythmisch ablaufenden Neubildung und Zerstörung der Pigmente. Es werden Schwankungen vielmehr vorgetäuscht. Die während des Tages unter Einwirkung des Lichtes gebildete Farbstoffmenge wird während der Nacht durch die Fortdauer der Wachstumsvorgänge auf eine größere Fläche verteilt. Sobald diese Entwicklungs- und Pigmentbildungsprozesse beendet sind, bleibt der Chlorophyllspiegel konstant, wie wir es an ausgewachsenen Blättern z. T. derselben Pflanze zeigen konnten.

Die mit unseren Ergebnissen in Widerspruch stehenden Befunde von GJUBBENET und BAZANOVA (1952) wurden mit einer unbrauchbaren Bezugsgröße gewonnen. Genannte Autoren verwendeten bei ihren Untersuchungen über die „Tagesperiodischen Schwankungen im Chlorophyllgehalt der Kartoffelblätter" als Bezugssystem das Frisch- und Trockengewicht, ohne Angabe, ob ihre Ergebnisse die notwendigen Korrekturen erfahren haben.

Es würde zu weit führen, nochmals die gesamte Diskussion um die Befunde von BUKATSCH und seiner Mitarbeiter in vollem Umfang aufzurollen. SEYBOLD (1942) hat hierzu bereits kritisch Stellung genommen. Theoretische Erwägungen und Ergebnisse einer experimentellen Nachprüfung ließen SEYBOLD zu dem Schluß kommen, daß die von BUKATSCH ausgeführten Pigmentanalysen fehlerhaft waren, so daß beträchtliche Schwankungen im Chlorophyllgehalt vorgetäuscht wurden[1].

Vergleichen wir nun unsere Ergebnisse mit denen von STEUER (1945), die bei ihren Pigmentbestimmungen eine Trennung der Chlorophylle vornahm. STEUER zeitigte dabei das auffallende Ergebnis, Chlorophyll b unterliege stärkeren Schwankungen als Chlorophyll a. Dieser Befund steht aber nicht nur im Gegensatz zu unseren eigenen Resultaten, sondern widerspricht allen bisherigen Erfahrungen. Denn in jedem Fall — sei es beim herbstlichen (NAGEL 1940, BAUER 1956) oder beim experimentell herbeigeführten Abbau (EGLE 1944) — erwies sich Chlorophyll a als labiler. Eine größere Labilität von Chlorophyll b konnte seither noch nicht festgestellt werden.

Gerade dieser Befund von STEUER scheint uns darauf hinzudeuten, daß auch sie mit einer ungenügenden Methode gearbeitet hat. Wenn STEUER zum Nachweis für die Reinheit der getrennten Chlorophyllkomponenten eine Abbildung der Absorptionsspektren anführt, so sagt dies nur sehr wenig. Im Verlaufe der Serienanalysen, bei deren Aufarbeitung eine solche Kontrolle am nötigsten wäre, wurde anscheinend keine Reinheitsprüfung mehr vorgenommen. Die von STEUER gefundene Labilität von Chlorophyll b erfährt nun zwanglos ihre Erklärung: Bei einer chromatographischen Aufarbeitung der Chlorophylle von so geringem Ausgangsmaterial (2—6 cm^2 Blattfläche), wie es STEUER zu ihren Analysen verwendete, sowie bei dem anschließenden subjektiven Meßverfahren des Photometrierens wird sich natürlich ein Fehler bestimmter Größe auf die relativ geringere Menge von Chlorophyll b prozentual stärker auswirken als auf die von Chlorophyll a.

Ebenso unzutreffend wie die Befunde von BUKATSCH und seinen Mitarbeitern sind auch die ihnen beigegebenen Deutungen. Betrachten wir zunächst die von BUKATSCH und WENDEL aufgezeigten unterschiedlichen Schwankungsabläufe. Während alpine Pflanzen am natürlichen Standort ein Mittags*minimum* im Farbstoffgehalt aufweisen, zeigen die Pflanzen derselben Art in der Ebene ein ausgeprägtes Mittags*maximum*. Ein Verbringen der Alpenpflanzen in die Ebene soll eine sukzessive Umstellung der „Tagesrhythmik" zur Folge haben. — Ferner sollen die Außenblätter von *Polygonum* um die Tagesmitte eine Zunahme,

[1] WENDEL (1949) mußte unterdessen auch mitteilen, daß die Werte von BUKATSCH einer Korrektur bedürfen; die von WENDEL ermittelten Schwankungen haben ein geringeres Ausmaß als ursprünglich angegeben.

hingegen die aus dem Inneren des Busches entnommenen Proben um die gleiche Zeit eine Abnahme des Blattgrüngehaltes aufweisen. Es ist demnach keineswegs verwunderlich, daß zur Erklärung der zeitlichen Diskrepanzen in der Lage des Maximums eine „physiologische Selbststeuerung" herangezogen werden muß, die sich „in sich ablösenden Prozessen, zwei Phasen gegenläufigen Geschehens" manifestieren soll.

Auch die von WENDEL (1957) für die Pigmentschwankungen als solche angeführte Deutung entbehrt jeglicher fundierten Grundlage. Nach WENDEL soll die kurzfristige Zu- und Abnahme des Chlorophyllgehaltes in Analogie zur Hydrierung von Protochlorophyll zu Chlorophyll als eine reversibel verlaufende Dehydrierung von Chlorophyll zu Dehydrochlorophyll aufgefaßt werden. Hierzu aber sei bemerkt, daß sich bislang weder die Reaktion Protochlorophyll → Chlorophyll a (KOSKI 1950, SMITH 1954, VIRGIN 1955) als umkehrbar erwiesen hat noch eine andere Form der Dehydrierung von Chlorophyll in vivo gefunden werden konnte.

Unverständlich erscheint es uns, daß WENDEL (1957) auch die Befunde von MONTFORT und ZÖLLNER (1942) neuerdings im Sinne einer reversiblen Tagesschwankung des Chlorophyllgehaltes auszulegen versucht, obgleich es zusammenfassend in deren Arbeit wörtlich heißt, daß „die von BUKATSCH und WENDEL vorgetragene Anschauung von dem Auftreten starker Tagesschwankungen des Chlorophyllgehaltes und eines sehr erheblichen Chlorophyllschwundes bei Landpflanzen aus mittlerem und starkem Tageslicht als irrig abzulehnen" sei.

Eine nochmalige Richtigstellung bedarf an dieser Stelle ein Befund NAGELS (1940), der unbegreiflicherweise von BUKATSCH (1942) völlig falsch gedeutet wurde. NAGEL fand im jungen, wachsenden Tabakblatt zwischen Basis und Spitze eine Differenz im Farbstoffgehalt von 300 bis 400%, was aber nicht heißt, daß der Chlorophyllgehalt an der Basis oder an der Spitze um solche Beträge schwankt.

Mit der Feststellung einer Konstanz der Chlorophylle im Laufe eines Tages schließen wir selbstverständlich keineswegs eine *irreversible* photooxydative Zerstörung der Pigmente aus, wie sie an abnormen Formen z. B. Aurea-Varietäten (MONTFORT 1948, ZAHN 1952, MICHAEL 1953) und bei anderen Pflanzen nach „gewaltsamen" Eingriffen (MONTFORT und ZÖLLNER 1942) beobachtet werden konnte. Ebenso wird es von niemandem bezweifelt, daß quantitative Veränderungen des Chlorophyllgehaltes im Verlaufe einer ganzen Vegetationsperiode (MONTFORT und Mitarbeiter 1953, BAUER 1956) durchaus möglich sind.

Erwähnt sei noch, daß der bei manchen Pflanzen unter dem Einfluß des Lichtes beobachtete Farbwechsel der Spreite als Folge einer Chloroplastenverlagerung (STAHL 1909, SUESSENGUTH 1925, VOERKEL 1934, ZURZYCKA und ZURZYCKI 1953, SEYBOLD 1955) unser Problem nur

peripher berührt. Diese Erscheinung hat nichts zu tun mit einer Tagesperiodizität des Chlorophyllgehaltes.

Abschließend können wir auf Grund unserer Ergebnisse sagen, daß die bisherige Auffassung von der Stabilität der Chlorophylle in den Plastiden auch weiterhin zu Recht besteht. Bleibt also nur zu hoffen, daß anderslautende, mit ungenügenden Methoden gewonnene Ergebnisse und vor allem die daran geknüpften falschen Schlußfolgerungen keinen weiteren Eingang in die Literatur finden mögen.

Vorliegende Arbeit wurde im Rahmen umfangreicher pigmentphysiologischer Untersuchungen am Botanischen Institut der Universität Heidelberg ausgeführt. Herrn Professor Dr. A. Seybold bin ich für wertvolle Anregungen, der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die Bereitstellung der Mittel und Geräte zu besonderem Dank verpflichtet.

Literatur

Bauer, A.: Beiträge zur Pigmentphysiologie der Blätter von Aurea-Varietäten. Beitr. Biol. Pflanz. **32**, 403—426 (1956). — Bode, O.: Über Zusammenhänge zwischen CO_2-Assimilation und Photoperiodismus bei Kalanchoe Blossfeldiana. Planta (Berl.) **33**, 278—289 (1942). — Bukatsch, F.: Tagesschwankungen des Blattgrüngehaltes alpiner Pflanzen. I. u. II. Z. ges. Naturwiss. **5**, 263—273 (1939); **6**, 197—198 (1940). — Zur chromatographischen Bestimmungsmethode des Blattgrüngehaltes. Z. ges. Naturwiss. **3/4**, 79—86 (1942). — Comar, C. L., and F. P. Zscheile: Analysis of plant extracts for Chlorophyll a and b by a photoelectric spectrophotometric method. Plant Physiol. **17**, 198—209 (1942). — Egle, K.: Zur Kenntnis des Lichtfeldes der Pflanze und der Blattfarbstoffe. Planta (Berl.) **26**, 546—583 (1937). — Untersuchungen über die Resistenz der Plastidenfarbstoffe. Bot. Archiv **45**, 93—148 (1944). — Falk, H.: Ein Beitrag zur quantitativen Chlorophyllbestimmung. Planta (Berl.) (im Druck). — Gjubbenet, E. R. G., i N. V. Bazanova: Tagesperiodische Schwankungen im Chlorophyllgehalt der Kartoffelblätter. Dokl. Akad. Nauk. SSSR. **105**, 586—587 (1955). — Koski, V. M.: Chlorophyll formation in seedlings of Zea Mays L. Arch. of Biochem. **29**, 339—343 (1950). — Livingston, R.: Zit. nach Smith, J. H. C., and A. Benitez in Paech-Tracey, Moderne Methoden der Pflanzenanalyse, Bd. IV. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1955. — Mackinney, G.: Criteria for purity of chlorophyll preparations. J. of Biol. Chem. **132**, 91—109 (1940). — Michael, K.: Vergleichende Untersuchungen über die Farbeigenschaften und den Bau der Blätter von Aurea-Varietäten verschiedener Gehölze. Züchter **23**, 296—317 (1953). — Montfort, C.: Sonnen- u. Schattenblätter als biochemische und physiologische Reaktionstypen. Natur u. Volk **78**, 7—8 (1948). — Montfort, C., J. Felgner u. L. Müller: Zeitphasen im Jahreslauf des lichtökologischen Chlorophyllspiegels beim photostabilen Laubblatt. Beitr. Biol. Pflanz. **29**, 106—128 (1953). — Montfort, C., u. G. Zöllner: Beständigkeit und Zerstörung des Chlorophylls im Blatt. Bot. Archiv **43**, 393—460 (1942). — Nagel, W.: Über die Blattfarbstoffe des Tabaks. Bot. Archiv **40**, 1—57 (1940). — Röbbelen, G.: Untersuchungen an strahleninduzierten Blattfarbmutanten von Arabidopsis thaliana (L) Heynh. Z. Abstammungslehre **88**, 189 bis 252 (1957). — Seybold, A.: Über den Lichtgenuß der Sonnen- und Schattenpflanzen. Ber. dtsch. bot. Ges. **52**, 493—505 (1934). — Über den Lichtfaktor photophysiologischer Prozesse. Jb. wiss. Bot. **82**, 741—795 (1936). — Weist der Chlorophyllgehalt der Blätter Tagesschwankungen auf? Bot. Archiv **43**, 71—77 (1942). — Beiträge zur Optik der Laubblätter. Beitr. Biol. Pflanz. **31**, 499—513

(1955). — Seybold, A., u. K. Egle: Lichtfeld und Blattfarbstoffe. I. u. II. Planta (Berl.) **26**, 491—515 (1937); **28**, 87—123 (1938). — Zur chromatographischen Methode der Blattpigmente. Planta (Berl.) **29**, 114—118 (1938). — Sironval, C.: A propos du métabolisme de la chlorophylle dans le feuille (Ses rapports avec la floraison). Bull. Soc. roy. bot. Belg. **85**, 285—295 (1953). — Smith, J. H. C., and A. Benitez: The effect of temperature on the conversion of protochlorophyll to chlorophyll a in etiolated barley leaves. Plant Physiol. **29**, 135—143 (1954). — Chlorophylls: Analysis in Plant Materials. Encyclopedia of Plant Physiology, vol. IV, edit. W. Ruhland. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1955. — Stahl, E.: Zur Biologie des Chlorophylls. Jena: Gustav Fischer 1909. — Steuer, I.: Tagesperiodische Veränderlichkeit des Chlorophyllgehaltes grüner Blätter. Diss. München 1945. — Suessenguth, K.: Über den tagesperiodischen Farbwechsel von Selaginella serpens. Biol. Zbl. **43**, 123—129 (1923). — Virgin, H. I.: The Conversion of Protochlorophyll to Chlorophyll a in Continuous and Intermittent Light. Physiol. Plantarum (Copenh.) 8, 389—403 (1955). — Voerkel, S. H.: Untersuchungen über die Phototaxis der Chloroplasten. Planta (Berl.) **21**, 156—205 (1934). — Wendel, K.: Tagesschwankungen des Blattgrüngehaltes bei Pflanzen ebener Standorte. Z. ges. Naturwiss. **6**, 327—329 (1940). — Beiträge zur photometrischen Messung von Chlorophyll-Lösungen. Planta (Berl.) **36**, 71—80 (1949). Beiträge zur chromatographischen Analyse von Chlorophyll-Lösungen und deren colorimetrischen und photometrischen Messung. Planta (Berl.) **37**, 604—611 (1950). — Über die Veränderlichkeit des Chlorophyllgehaltes einiger Pflanzen im Ablauf eines Tages. Protoplasma (Wien) **48**, 382—397 (1957). — Willstätter, R., u. A. Stoll: Untersuchungen über die Assimilation der Kohlensäure. Berlin: Springer 1918. — Zahn, R.: Lichtökologische Untersuchungen der Chloroplastenfarbstoffe photolabiler Pflanzen. Diss. Frankfurt 1952. — Zurzycka, A., and J. Zurzycki: Studies on the phototactic movements of chloroplast. I. Acta Soc. Bot. Pol. **22**, 667—678 (1953).

Dr. A. Bauer,
Gladbeck i. Westf., Lessingstr. 7

Planta, Bd. 51, S. 99—102 (1958)

Aus dem Botanischen Institut der Universität Marburg a. d. Lahn

Kurze Mitteilung

VERGLEICHENDE UNTERSUCHUNGEN AN MEIOTISCHEN UND ENDOMITOTISCHEN CHROMOMEREN VON GENTIANA CRUCIATA L.

Von

WALDTRAUT LANDMANN

Mit 1 Textabbildung

(Eingegangen am 20. Dezember 1957)

Die Frage nach der Natur der bei pflanzlichen Endomitosen auftretenden Körnchenstrukturen ist wiederholt angeschnitten worden (z. B. GEITLER 1953; TSCHERMAK-WOESS und HASITSCHKA 1953; CARNIEL 1954; STEFFEN 1955; STEFFEN und LANDMANN 1958a, b). Für diese Strukturen wird der Terminus „Chromomeren" gebraucht, ohne daß der übereinstimmende Bau mit den in den ersten Meiosestadien auftretenden Chromomeren nachgewiesen ist. Es fehlte ein Objekt, das für Vergleichsmessungen an endomitotischen und meiotischen Kernen bei weitgehender Ausschaltung von Fehlermöglichkeiten infolge unterschiedlicher Vorbehandlung geeignet gewesen wäre. In dieser Hinsicht verwendbar sind jedoch die Antheren von *Gentiana cruciata* L. Sie besitzen ein celluläres, einkerniges Balkentapetum, dessen Kerne einen Endomitosecyclus durchmachen, wodurch sie tetraploid werden. Da dieser Vorgang während der 1. meiotischen Prophase in den Pollenmutterzellen abläuft, besteht die Möglichkeit, meiotische Chromomeren und endomitotische Körnchenstrukturen in gleichartig behandelten Schnitten, sogar im gleichen Loculus zu messen.

Das Material von *Gentiana cruciata* L. stammt aus dem Botanischen Garten der Universität Marburg. Die Fixierung der Antheren erfolgte nach NAWASHIN. Die Schnittdicke betrug 10 μ. Es kamen nur nach FEULGEN gefärbte Schnitte zur Auswertung. Die Untersuchungen wurden mit dem Dialux ($^1/_{12}$ Fluorit-Immersion, LEITZ) und Benutzung eines strengen Grünfilters zur Erhöhung des Kontrastes durchgeführt. Der Durchmesser der Chromomeren wurde mit dem Okularschraubenmikrometer der Firma Leitz (12,5×) bei jeweils dreimaliger Kontrolle gemessen. Sämtliche Meßwerte, abgesehen von denen mitotischer Chromomeren, stammen von Kernen des gleichen Loculus. Die statistische Sicherung erfolgte nach KUCKUCK-MUDRA (1950).

Das Antherentapetum von *Gentiana cruciata* besitzt endomitotische Interphasekerne (Grobstrukturkerne) mit lockeren Chromozentren. Diese setzen sich stets aus großen, stark färbbaren und häufig mehrschichtig gelagerten sowie kleinen, entsprechend schwach färbbaren, oft reihenförmig ausstrahlenden Chromomeren zusammen (Abb. 1a). (Außerdem sind die SAT-Chromozentren zu nennen, die aber bei *Gentiana* niemals Chromomerenbau zeigen und deshalb unberücksichtigt blieben).

Auf Einzelheiten über den Ablauf der Endomitose und die indirekte Ermittlung des Polyploidiegrades im Tapetum von *Gentiana* soll an dieser Stelle nicht eingegangen werden. (Genaue Darstellung bei LANDMANN 1956; STEFFEN und LANDMANN 1958a).

Im Feinstrukturkern sind die Chromozentren flach ausgebreitet in unregelmäßigen Arealen an der Kernperipherie zu beobachten. Nach wie vor sind die Größen- und damit die Färbungsunterschiede bei den Chromomeren vorhanden; jedoch ist jetzt die kleine Chromomerenart weniger scharf konturiert, wodurch die Messungen erschwert werden.

Die Chromomeren besitzen stets regelmäßige Kugelform; die Messungen konnten deswegen auf einen Durchmesser beschränkt werden. Formveränderungen oder Teilungsfiguren (Hantelformen) wurden niemals beobachtet.

Die Größe der beiden Chromomerenarten ist in Grob- und Feinstrukturkern gleich, weswegen die Meßreihen nachträglich zusammengefaßt werden konnten. Es ergibt sich für die stark färbbaren Körnchen ein Durchmesser von 0,35 μ, für die schwach färbbaren Körnchen von 0,21 μ im Mittel. Der Unterschied ist signifikant ($p = <0{,}1\,\%$).

Tabelle 1. *Gentiana cruciata* L. Durchmesser der endomitotischen, meiotischen und mitotischen Chromomeren

	Mittelwert in μ	Zahl der Messungen	p-Wert in %
Endomitotische Chromomeren			
a) stark färbbar	$0{,}35 \pm 0{,}01$	27	$< 0{,}1$
b) schwach färbbar . .	$0{,}21 \pm 0{,}007$	21	
Meiotische Chromomeren			
a) gepaart	$0{,}37 \pm 0{,}01$	27	$< 0{,}1$
b) ungepaart	$0{,}22 \pm 0{,}005$	26	
Mitotische Chromomeren	$0{,}31 \pm 0{,}002$	15	

In den meiotischen Kernen treten ebenfalls zwei Chromomerensorten auf, von denen sich die größeren und stark gefärbten als bereits gepaart, die kleinen, schwach färbbaren als ungepaart erwiesen (vgl. Abb. 1 b und c). Die Durchmesserwerte betragen: 0,37 μ und 0,22 μ im Mittel. Auch diese Differenz ist sehr gut gesichert. (Vgl. Tabelle 1.)

Für diese Messungen wurde das Zygotän gewählt, da sich das Pachytän nicht als das Stadium maximaler Chromosomenstreckung erwies, sondern bereits die Spiralisierung eingesetzt hatte. (Vgl. auch LINNERT 1955 an *Salvia*-Arten, OEHLKERS und EBERLE 1957 an *Bellevalia romana*, v. WANGENHEIM 1957 bei *Solanum* und SCHERZ 1957 an Compositen).

Die statistische Sicherung ergab: Die Differenz der großen Chromomeren von Endomitose und Meiose und entsprechend die Differenz der kleinen Chromomeren beider Prozesse ist nicht gesichert ($p = 31{,}7$

und 27,6%). *Das heißt, daß die beiden meiotischen Chromomerenarten und die beiden endomitotischen Körnchenstrukturen größengleich sind. Aus diesem Ergebnis darf geschlossen werden, daß bei Gentiana cruciata die während der Endomitose auftretenden Körnchenstrukturen mit größter Wahrscheinlichkeit echte Chromomeren darstellen.*

Die Ergebnisse dieser Beobachtungen und Messungen erlauben dagegen nicht, Aussagen darüber zu machen, ob eu- oder heterochromatische Chromomeren oder beide Arten vorliegen. Auch Messungen an mitotischen Chromomeren, die während des prophasischen Zerstäubungsstadiums auftreten, führen nicht weiter. Diese vermutlich heterochromatischen, einheitlich gefärbten Chromomeren besitzen einen Durchmesser von 0,31 μ im Mittel. Die Differenzen zu sämtlichen angeführten Meßwerten sind sehr gut, in einem Falle gut gesichert. Es handelt sich also um eine andere Größenklasse, weswegen Vergleiche und Analogieschlüsse unmöglich sind.

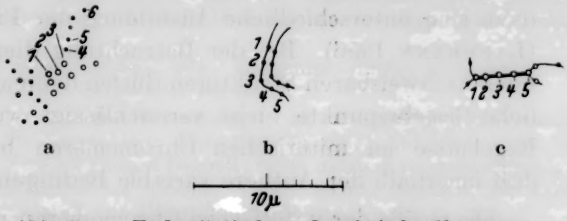


Abb. 1a—c. Endomitotische und meiotische Chromomeren von *Gentiana cruciata* L. a Ausschnitt aus einem Grobstrukturkern des Antherentapetums. b und c Abschnitte von Zygotänchromosomen der Pollenmutterzellen; in b ungepaart, in c teilweise gepaart. Für die mit Ziffern bezeichneten Chromomeren werden die Meßwerte angegeben (Tabelle 2)

Tabelle 2. *Meßwerte zu Abb. 1*

Figur a		Figur b		Figur c	
Nr.	μ	Nr.	μ	Nr.	μ
1	0,33	1	0,17	1	0,39
2	0,30	2	0,20	2	0,46
3	0,36	3	0,17	3	0,33
4	0,17	4	0,20	4	0,30
5	0,17	5	0,20	5	0,26
6	0,13				

Für die Bestimmung des Durchmessers mitotischer Chromomeren wurden Kerne aus der Fruchtknotenwandung gewählt, die dem Loculus, aus dem die übrigen Meßwerte stammen, unmittelbar benachbart lag. Um gewebespezifische Unterschiede möglichst auszuschließen, wurden zu den Messungen auch Kerne eines jüngeren Entwicklungsstadiums der Antheren herangezogen. Das Meßergebnis ist mit dem oben angeführten identisch. Diese Kerne befanden sich in den peripheren Schichten des sekundären Archespors, in dem die letzten Mitosen abliefen. Die Zellen standen also unmittelbar vor der Differenzierung zu Tapetumzellen. (Diese setzt erst nach Abschluß aller Zellteilungen innerhalb des zukünftigen Archesporkomplexes ein, weswegen Messungen an mitotischen Kernen älterer Stadien nicht möglich sind. Die Beschreibung der Entwicklungsgeschichte des Tapetums von Gentiana s. bei LANDMANN 1956).

Im Hinblick auf die problematische Natur der Chromomeren sei erwähnt, daß mit diesem Terminus Chromosomenstrukturen bezeichnet werden, die — wie sich zeigt — in Kernen unterschiedlicher Gewebe in verschiedenen Größenordnungen auftreten können. Pollenmutter-

und Tapetumzellen haben bei *Gentiana* die gleiche Herkunft (sekundäres Archespor) und zeigen nach ihrer Ausdifferenzierung bei den gleichzeitig beginnenden karyologischen Veränderungen Kernstrukturen gleicher Größenordnung. Diese Tatsache legt die Deutung nahe, daß es sich bei Chromomeren nicht um konstante Bauelemente der Chromosomen, sondern um Differenzierungsstrukturen handelt. Bei *Gentiana* scheint einer der möglichen Einflüsse im ganzen Loculus einheitlich auf beide Zellarten zu wirken, unabhängig von solchen, die im Gegensatz dazu eine unterschiedliche Ausbildung der Plasmastrukturen bewirken (LANDMANN 1956). Bei der Betrachtung dieser kleinsten, lichtoptisch noch nachweisbaren Strukturen dürfen demnach entwicklungsgeschichtliche Gesichtspunkte nicht vernachlässigt werden. Die abweichenden Ergebnisse an mitotischen Chromomeren bestärken den Gedanken, daß innerhalb der Anthere variable Bedingungen wirken.

Die Größe der mitotischen Chromomeren und ihr Auftreten in einer einzigen Größenkategorie bestätigt außerdem die früher gemachte Aussage, daß sich bei *Gentiana cruciata* endomitotische Feinstruktur und mitotisches Zerstäubungsstadium nicht gleichen (STEFFEN und LANDMANN 1958a).

Literatur

CARNIEL, K.: Endomitosen im zellulär-einkernigen Tapetum. Kurze Mitteilung. Öst. bot. Z. **101**, 435—436 (1954). — GEITLER, L.: Endomitose und endomitotische Polyploidisierung. Protoplasmatologia C, **6**, 1—89 (1953). — KUCKUCK, H., u. A. MUDRA: Lehrbuch der allgemeinen Pflanzenzüchtung. Stuttgart: S. Hirzel 1950. — LANDMANN, W.: Embryologische und zytologische Untersuchungen am Balkentapetum von Gentiana cruciata L. und Impatiens glandulifera ROYLE. Diss. Marburg 1956. — LINNERT, G.: Die Struktur der Pachytänchromosomen in Euchromatin und Heterochromatin und ihre Auswirkung auf die Chiasmabildung bei *Salvia*-Arten. Chromosoma **7**, 90—128 (1955). — OELHKERS, F., u. P. EBERLE: Spiralen und Chromomeren in der Meiosis von Bellevalia romana. Chromosoma **8**, 351—368 (1957). — SCHERZ, C.: Die Chromosomenstruktur in der meiotischen Prophase einiger Compositen. Chromosoma **8**, 447—457 (1957). — STEFFEN, K.: Kern- und Nucleolenwachstum bei endomitotischer Polyploidisierung. (Ein Beitrag zur karyologischen Anatomie von Pedicularis palustris L.). Planta (Berl.) **45**, 379—394 (1955). — STEFFEN, K., u. W. LANDMANN: Embryologische und cytologische Untersuchungen am Balkentapetum von Gentiana cruciata L. und Impatiens glandulifera ROYLE. Planta (Berl.) **50**, 423—460 (1958a). — Chondriosomen-, Sphärosomen- und Proplastidenzahlen in Beziehung zu den Differenzierungsvorgängen bei der Antherenentwicklung. Planta (Berl.) **51**, 30—48 (1958b). — TSCHERMAK-WOESS, E., u. G. HASITSCHKA: Veränderungen der Kernstruktur während der Endomitose, rhythmisches Kernwachstum und verschiedenes Heterochromatin bei Angiospermen. Chromosoma **5**, 574—614 (1953). — WANGENHEIM, K.-H. Frhr. v.: Das Pachytän und der weitere Ablauf der Meiose in diploiden Solanum-Arten und -Bastarden. Chromosoma **8**, 671—690 (1957).

Dr. WALDTRAUT LANDMANN,
Institut für Entwicklungsphysiologie der Universität,
Köln-Lindenthal, Gyrhofstr. 17

Aufnahmebedingungen

Die Arbeit muß dem Gebiet der Zeitschrift angehören und wissenschaftlich Neues bringen. Arbeiten, die ausschließlich praktischen Zwecken dienen, scheiden aus.

Bei Arbeiten aus Instituten ist eine Erklärung des Direktors oder eines Abteilungsleiters beizufügen, daß er mit der Publikation der Arbeit aus dem Institut bzw. der Abteilung einverstanden ist und den Verfasser auf die Aufnahmebedingungen aufmerksam gemacht hat.

Das Manuskript muß leicht leserlich geschrieben und völlig druckfertig sein; andernfalls sind Verzögerungen im Erscheinen unvermeidlich. Korrekturen im Satz müssen auf das sachlich Notwendige beschränkt werden.

Für die Rechtschreibung ist die „Wissenschaftliche Rechtschreibung nach JANSEN" maßgebend, mit der die Schreibung der Termini im „Handwörterbuch der Naturwissenschaften" (Jena 1931—1934) im wesentlichen übereinstimmt. Wenn nötig, wird die Angleichung durch die Herausgeber bzw. durch die Druckerei vorgenommen.

Die Darstellung soll möglichst kurz sein. Ergebnisse dürfen nicht gleichzeitig in Tabellen- und Kurvenform dargestellt werden.

Die Abbildungen sind auf das Notwendigste zu beschränken, insbesondere die Reproduktion von Photographien. Einzelfiguren einer Abbildung sind, falls es sich um Vorlagen für Strichätzungen handelt, wenn möglich so zusammenzustellen, daß sie in *einem* Klischee bei gleicher Verkleinerung reproduziert werden können. Buchstaben u. a. sind mit Bleistift beizufügen.

Die Texte zu den Abbildungen sind auf eigenem Blatt gesammelt beizugeben.

Bei einleitenden Literaturbesprechungen soll möglichst auf zusammenfassende Darstellungen verwiesen und nur das zum unmittelbaren Verständnis Notwendige gebracht werden.

Der Arbeit ist eine Zusammenfassung der wichtigsten Ergebnisse (höchstens 1 Seite) anzufügen, die in Deutsch oder Englisch oder Französisch abgefaßt sein kann.

Zu den Literaturverzeichnissen: Bei Zeitschriftenartikeln sollen der Titel sowie erste und letzte Seite angegeben werden. In den Titeln von Büchern aller Sprachen sollen, zur Kennzeichnung gegenüber Artikeln in Zeitschriften, Substantiva wie Adjektiva groß, dagegen in den Abkürzungen von Zeitschriftentiteln die Substantiva groß und die Adjektiva klein geschrieben werden (z. B. Cell Res., aber cell. Physiol.).

Fortschritte der Chemie organischer Naturstoffe

Progress in the Chemistry of Organic Natural Products

Progrès dans la chimie des substances organiques naturelles

Herausgegeben von **L. Zechmeister,** California Institute of Technology, Pasadena.

Vierzehnter Band. Mit 38 Abbildungen. VIII, 377 Seiten Gr.-8°. 1957.

DM 71.—; Ganzleinen DM 75.—

Inhaltsverzeichnis: **Bohlmann, F.,** und **H. J. Mannhardt,** Acetylenverbindungen im Pflanzenreich. — **Tamm, Ch.,** Neuere Ergebnisse auf dem Gebiete der glykosidischen Herzgifte: Zucker und Glykoside. — **Brockmann, H.,** Photodynamisch wirksame Pflanzenfarbstoffe. — **Birch, A. J.,** Biosynthetic Relations of Some Natural Phenolic and Enolic Compounds. — **Sobotka, H., N. Barsel** and **J. D. Chanley,** The Aminochromes. — **Morton, R. A.,** and **G. A. J. Pitt,** Visual Pigments. — **Brown, H.,** The Carbon Cycle in Nature.

SPRINGER-VERLAG / WIEN

Anleitungen
für die chemische Laboratoriumspraxis

Herausgegeben von **H. Mayer-Kaupp.**

Erster Band: **Seith und Ruthardt,**

Chemische Spektralanalyse

Eine Anleitung zur Erlernung und Ausführung von Emissions-Spektralanalysen. Fünfte, neu bearbeitete Auflage von **Walter Rollwagen.** Mit 80 Abbildungen im Text und einer Tafel. VIII, 162 Seiten 8°. 1958. Steif geheftet DM 26.—

Inhaltsübersicht: Einleitung. Erster Abschnitt: **Theoretische und experimentelle Vorbereitung.** 1. Allgemeine Grundlagen: Die Lichtemission der Atome. Die Farbzerlegung des Lichts. Die Empfänger. Die Lichtführung in optischen Anordnungen. Anregungsarten. 2. Experimentelle Grundlagen: Das Arbeiten mit dem Spektralapparat. Das Arbeiten mit dem Projektor. Spektren und letzte Linien. Das Arbeiten mit dem Photometer. Die photographische Platte. Intensitätsverhältnisse von Spektrallinien. — Zweiter Abschnitt: **Analytischer Teil.** 3. Zusammenfassende Einführung in die Emissionsspektralanalyse. 4. Die qualitative Analyse. 5. Halbquantitative Analyse. 6. Die quantitative Analyse. 7. Ergänzungen. 8. Ausblick. — Verzeichnis einiger Bücher und Tabellen. — Spezialausdrücke zur Spektralanalyse. — Sachverzeichnis. — Tafel der Spektren der wichtigsten Elemente.

Zweiter Band:

Kolorimetrie, Photometrie und Spektrometrie

Eine Anleitung zur Ausführung von Absorptions-, Emissions-, Fluorescenz-, Streuungs-, Trübungs- und Reflexionsmessungen. Von **Gustav Kortüm.** Dritte neubearbeitete Auflage. Mit 186 Abbildungen. VIII, 458 Seiten 8°. 1955. Ganzleinen DM 36.—

Vierter Band:

Polarographisches Praktikum

Von **J. Heyrovský.** Mit 90 Abbildungen im Text. VI, 118 Seiten 8°. 1948. DM 8.40

Fünfter Band:

Der Raman-Effekt und seine analytische Anwendung

Von **Walter Otting.** Mit 33 Abbildungen. VI, 161 Seiten 8°. 1952. Steif geheftet DM 12.60

Sechster Band:

Gegenstromverteilung

Von **H. M. Rauen** und **W. Stamm.** Mit 65 Abbildungen. VII, 81 Seiten Gr.-8°. 1953. Steif geheftet DM 12.80

Siebenter Band:

Mikrochemisches Praktikum

Von **G. Gorbach.** Mit 72 Abbildungen im Text. VIII, 123 Seiten 8°. 1956. Steif geheftet DM 15.—

Achter Band:

Tabellen zur Röntgenstrukturanalyse

Von **Konrad Sagel.** VIII, 204 Seiten Gr.-8°. 1958. Steif geheftet DM 28.—

SPRINGER-VERLAG / BERLIN · GÖTTINGEN · HEIDELBERG

Springer-Verlag, Berlin · Göttingen · Heidelberg — Druck der Universitätsdruckerei H. Stürtz AG., Würzburg
Printed in Germany